GammaCoat® Plasma Renin Activity
^{125}I RIA Kit

For the quantitative determination of plasma renin activity (PRA) by the radioimmunoassay of generated angiotension I

Instruction Manual
Manuel d'Instructions
Testanleitung
Manual de Instrucciones
Manuale di Istruzioni
Manual de instruções
Bruksanvisning
Εγχειρίδιο οδηγιών

Catalog No. /REF./KAT.-NR./N° de Catálogo/Numero di Catalogo/Nº de Catálogo/Katalognummer/ Αριθμός καταλόγου: CA-1533, CA-1553

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English ..... Page 1
Français 13
Deutsch 26
Español 39
Italiano 52
Português 65
Svenska 78
Ελληνικά 90

GAMMACOAT® PLASMA RENIN ACTIVITY RADIOIMMUNOASSAY KIT

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

The GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity Radioimmunoassay Kit is to be used for the quantitative determination of plasma renin activity (PRA) by the radioimmunoassay of generated angiotensin I.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Renin, a proteolytic enzyme with a molecular weight of approximately 40,000, is released from the juxtaglomerular cells of the kidney. The enzyme acts in general circulation to cleave its substrate, an alpha-2 globulin synthesized by the liver, to produce the deca-peptide angiotensin I.

Angiotensin I is cleaved rapidly by the activity of converting enzyme, primarily in the lungs, to the biologically active octapeptide angiotensin II. In turn, angiotensin II is degraded rapidly to inactive peptide fragments by enzymes present in plasma and tissues, known as angiotensinases. The metabolic pathway of the renin angiotensin system is described below:

renin substrate
renin
↓
angiotensin I
converting enzyme
↓
angiotensin II
angiotensinases
↓
inactive peptide fragments

Angiotensin II has an extremely short *in vivo* half-life, but it is the most potent vasopressor known. Angiotensin II plays a key role in several forms of hypertension, as well as in blood pressure regulation. In addition, angiotensin II has been established as the major influence on aldosterone secretion by the adrenal gland.

Technical difficulties associated with the measurement of angiotensin II levels in blood have retarded general acceptance of its assay in the clinical laboratory. Since angiotensin I levels are a direct representation of plasma renin activity, the determination of plasma renin activity has been adopted widely to evaluate the renin-angiotensin system in disease states. Measurement of plasma renin activity in hypertensives is an important aid in the differential diagnosis of primary and secondary aldosteronism. Estimation of renin activity is also valuable in determining the prognosis and most appropriate therapy for persons with essential hypertension.

A radioimmunoassay for angiotensin I and its application as an index of plasma renin activity has been described.[1] The GammaCoat Kit procedure for determining plasma renin activity is adapted from this method.

3. PRINICIPLES OF THE ASSAY

The procedure is based on competitive binding principles of radioimmunoassay.[2] In the GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity RIA Kit, the antibody is immobilized onto the lower inner wall of the GammaCoat tube. The PRA determination involves an initial incubation of plasma to generate angiotensin I, followed by quantitation of angiotensin I by radioimmunoassay. The generation of angiotensin I in the human substrate system is governed by:

- **3.1** pH of the incubation.
- **3.2** extent of plasma dilution.
- **3.3** choice of enzyme inhibitors.
- **3.4** unknown factors in each individual plasma sample such as concentration of the renin substrate level.
- **3.5** length of incubation.
- **3.6** temperature of incubation.

Generation pH
The generation rate of angiotensin I *in vitro* is pH dependent. This kit procedure uses a generation pH of 6.0, the usual pH of samples after addition of pH 5.7 buffer. The advantage of incubation at pH 6.0, rather than the physiologic pH 7, is the twofold greater rate of generation of angiotensin I with correspondingly better sensitivity for low renin samples.[3-14] As a result of optimization, shorter generation times may be utilized.

Selection of Enzyme Inhibitor
A variety of agents can be employed to block enzymatic conversion of angiotensin I to angiotensin II and to prevent proteolytic degradation during generation of angiotensin I.[15-17] Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) is the inhibitor used in this procedure.

Effects of Plasma Dilution
Plasma dilution should be avoided since the renin reaction is substrate-dependent at the concentration of renin substrate which usually exists in plasma. The effects of substrate dilution can be seen at all intervals during generation, and more marked effects are seen at higher dilution.[4]

Length of Generation
The shortest practical time should be employed for determination of enzyme activity to provide the best estimate of initial velocity of the reaction and to minimize substrate consumption. The radioimmunoassay of angiotensin I is sensitive enough to permit PRA determination using optimized conditions of angiotensin I generation at pH 6.0.
The GammaCoat Plasma Renin Activity Kit method offers a reduced generation time because the plasma sample is minimally diluted, buffered at an optimized pH, and run with an inhibitor which is effective at the selected pH. It has been suggested that low level samples can be quantified by generating the samples for eighteen hours and then assaying.[4]

Length of Radioimmunoassay
The GammaCoat Plasma Renin Activity Kit method uses a three hour radioimmunoassay incubation. Results are available within the same working day.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Rabbit anti-Angiotensin I Coated Tubes	1 bag/100 tubes	5 bags/100 tubes
Angiotensin Assay Buffer (11x)	1 vial/10 mL	5 vials/10 mL
Angiotensin Maleate Generation Buffer	1 vial/5 mL	3 vials/5 mL
Angiotensin PMSF	1 vial/1 mL	2 vials/1 mL
Renin Activity Control	1 vial/3 mL	2 vials/3 mL
Angiotensin Calibrators (A-F)	6 vials/2 mL	12 vials/2 mL
Angiotensin Tracer	2 vials/5 mL	10 vials/5 mL
Number of tests	100	500

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After opening, store each reagent as recommended below. Reagents should not be used past the expiration date on the label. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 [^{125}I] Angiotensin I Tracer: lyophilized reagent
Reconstitute the [^{125}I] Angiotensin I Tracer vial by adding 5 mL purified water. Mix well by inverting or gently vortexing the vial. Add the contents of **two** tracer vials to 100 mL of assay buffer. The tracer-buffer reagent is stable at 2-8°C until the kit expiration date.
Upon reconstitution each vial contains approximately 1 µCi tracer (<1 µg/mL Angiotensin I) in 5 mL of phosphate buffered saline with bovine serum albumin with thimerosal added as a preservative.

4.2 Rabbit Anti-Angiotensin I Serum Coated Tubes: ready to use reagent
12 x 75 mm tubes are coated with rabbit anti-angiotensin I serum (titer <1 µg/tube) and packed in a plastic bag. Store at 2-27°C.

4.3 Angiotensin Assay Buffer Concentrate (11X): concentrated reagent
Add the entire contents of the assay buffer concentrate vial to 100 mL purified water and mix well. Each vial contains 10 mL of phosphate buffer with 0.1% sodium azide as a preservative.

4.4 Angiotensin Maleate Generation Buffer: ready to use reagent
Each vial contains 5 mL of maleate buffer, sodium EDTA, neomycin sulfate and inert blue coloring with 0.1% sodium azide as a preservative.

4.5 Angiotensin Phenylmethylsulfonyl Fluoride: ready to use reagent
Each vial contains 1 mL of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) in ethanol.

4.6 Renin Activity Control: lyophilized reagent
Reconstitute before use by pipetting 3.0 mL purified water at 2-8°C. Keep vial in an ice bath for 10 minutes, and gently vortex or swirl to mix thoroughly. Aliquot 1.0 mL portions into pre-chilled glass or plastic tubes. Seal tightly and store at -20°C. One aliquot may be kept in an ice bath or refrigerated at 2-8°C if the assay is performed at this time.
The reconstituted control must be stored frozen at -20°C and is stable for at least two months. Thawing must be done in an ice bath or in a refrigerator at 2-8°C and the reconstituted control must **not** be refrozen after thawing.
Variations in PRA have been observed upon repeated assay of frozen plasma after various periods of storage.[19,20] Thus, the use of stored frozen plasma as a control in PRA determinations may lead to unreliable results. The Renin Activity Control is utilized routinely during Angiotensin I **generation** as well as radioimmunoassay, providing a reliable quality control index for the entire assay. Refer to Quality Control section for more information.
Upon reconstitution each vial contains 3 mL of processed human plasma with 0.1% sodium azide.

4.7 Angiotensin I Calibrators (A-F): lyophilized reagent
NOTE: Blank and calibrators are used **only** in the radioimmunoassay portion and **must not** undergo angiotensin I generation.
Reconstitute each vial with 2.0 mL of purified water and mix well before use. Blank and calibrators should then be chilled in an ice bath before assaying. They may be stored at 2-8°C up to two weeks, and at -20°C for longer storage.

Upon reconstitution, each vial contains 2 mL of angiotensin I, BSA in phosphate buffered saline. Calibrators are calibrated at 0, 0.2, 0.8, 3.0, 10.0 and 50.0 ng/mL, respectively. The DiaSorin Plasma Renin Activity calibrators are calibrated using the current production master lot. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this *in vitro* diagnostic test as recommended.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.
Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

Treat as potentially infectious.
Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV, and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus, hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory

practices using appropriate precautions as described in the Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 4th ed., May 1999 or current edition.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING THIMEROSAL

Some reagents in this kit contain thimerosal which contains a mercury compound. Disposal of elemental mercury, inorganic mercury, mercury oxides and mercury compounds should be done in strict compliance with all local, state, and federal regulations.
WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause birth defects or other reproductive harm.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

Reagents Containing Ethanol

R11 - Highly flammable.
S16 - Keep away from sources of ignition — No smoking.
S43 - In case of fire, use dry chemical or carbon dioxide.

Reagents Containing PMSF

R23/24/25 - Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
S36 - Wear suitable protective clothing.
S45 - In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

Reagents Containing Potassium Hydroxide

R35 - Causes severe burns.
S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S37/39 - Wear suitable gloves and eye/face protection.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive materials which do not exceed 2 µCi (74 kBq – kit CA-1533) or 10 µCi (370 kBq – kit CA-1553) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:
This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.

5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

6. COLLECTION AND PREPARATION OF SPECIMEN

Plasma renin activity is highest in the morning because of diurnal variation in renin release, and samples should be collected regularly at that time.[18,19] A venous blood sample is collected aseptically using an evacuated glass tube containing EDTA. Samples may be collected, transported and centrifuged at room temperature. Blood can sit at room temperature for as long as six hours before centrifugation without significant accumulation of angiotensin I. After centrifugation of the blood, plasma can be stored frozen until assayed. Samples may be frozen at -20°C up to one month. Freeze-thaw cycles, which can occur in self-defrosting freezers, should be avoided. Variations in PRA have been observed both due to storage at 2-8°C, and to prolonged storage at -20°C.[20, 21]

Prior to assay, frozen samples should be thawed rapidly to room temperature.

Hemolyzed, lipemic, icteric or citrated samples should not be used. Do not use heparin as an anti-coagulant. See Procedural Limitations section for additional precautions and information.

7. MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

7.1 Purified water.

7.2 Constant temperature water bath, 37 ± 2°C.

7.3 Ice water bath.

7.4 Volumetric pipets (1, 2, 3 and 5 mL).

7.5 Graduated cylinder (100 mL).

7.6 Precision pipets (10, 100, 500 and 1000 µL).

7.7 Gamma counter.

7.8 Plastic or glass tubes, 12 x 75 mm (for angiotensin I generation).

7.9 Test tube racks.

7.10 Vortex mixer (optional).

7.11 Water aspirator (optional).

7.12 Plastic-backed absorbent paper (optional).

8. ANGIOTENSIN I GENERATION PROCEDURE

8.1 Transfer 1.0 mL of plasma to an **uncoated** glass or plastic tube marked with the identifying number and the suffix 37.

8.2 Add 10 µL of the PMSF solution and 100 µL of the maleate generation buffer (pH 6.0) to each 1.0 mL aliquot from step 1. Mix well and place in ice bath.

8.3 Transfer 500 µL of the plasma from step two to a corresponding chilled tube marked with the suffix 4.

8.4 Place the 37 series of tubes into a 37°C water bath. Maintain the 4 series of tubes in an ice bath. Run the maleate buffer generation for 90 minutes.

It has been suggested that patient samples with PRA values less than 1.0 ng/mL/hr may be generated in an eighteen hour incubation and then reassayed.[4] Calculations must be adjusted for any change in generation time.

8.5 At the end of the generation period, transfer the 37 series of samples either to the ice bath if the assay is to be performed immediately, or to the freezer along with the 4 series for future assay.

9. ASSAY PROCEDURE

The assay procedure includes the preparation of a calibrator curve from which the unknown angiotensin I content in both the 37 and 4 series samples is interpolated. The background (4 series) is then subtracted from the corresponding 37 generation samples.

9.1 Allow tracer-buffer reagent to reach ambient temperature and mix well before using. Maintain blank and calibrators, generated control, and generated patient samples in an ice bath and mix well before using.

9.2 Label a set of GammaCoat tubes in duplicate according to the following scheme. Total Counts [T_1,T_2] and B_0 tubes [1, 2] may be required for certain data reduction programs, but may be omitted if the calibrator curve is plotted on semi-logarithmic graph paper.[23-25]

Tube No.	Contents of Tubes		Code Letter	Angiotensin I (ng/0.1 mL)
T_1,T_2	Total Counts (Tracer-Buffer)			
1, 2	Angiotensin I Blank	0 ng/mL	A	0
3, 4	Angiotensin I Calibrator	0.2 ng/mL	B	0.02
5, 6	Angiotensin I Calibrator	0.8 ng/mL	C	0.08
7, 8	Angiotensin I Calibrator	3.0 ng/mL	D	0.30
9,10	Angiotensin I Calibrator	10.0 ng/mL	E	1.0
11,12	Angiotensin I Calibrator	50.0 ng/mL	F	5.0
13,14	Renin Activity Control, 37°C Generation			
15,16	Renin Activity Control, 4°C Generation			
17,18	Patient "X", 37°C Generation			
19, 20	Patient "X", 4°C Generation			

9.3 Pipet into the appropriate duplicate tubes:

a. 100 µL of each angiotensin I blank or calibrator.

b. 100 µL of the "37" and "4" generation set renin activity control to the appropriate group of 4 tubes.

c. 100 µL of each "37" and "4" generation set patient sample to the appropriate group of 4 tubes.

9.4 Immediately add 1.0 mL of tracer-buffer reagent to each tube, including Total Counts. Mix reagents by gently vortexing each tube.

9.5 Incubate all tubes at room temperature (20-27°C) for three hours.

9.6 Aspirate or decant all tubes, except Total Counts.

FAILURE TO REMOVE ADHERING SOLUTION ADEQUATELY MAY RESULT IN POOR REPLICATION AND SPURIOUS VALUES.

If the aspirating technique is used, be sure that the plastic tip of the aspirating tube touches the bottom of the coated tube and that all liquid is removed.

If the decanting technique is used, allow the tubes to drain in an inverted position for 3-5 minutes. Tap the tubes on absorbent paper to remove any adhering liquid before placing them upright.

9.7 Count all tubes in a gamma counter for one minute with the window suitably adjusted for iodine-125.

9.8 Calculate results. Refer to Results section.

10. QUALITY CONTROL

One Renin Activity Control is provided in the kit. See vial label for nominal value. The control must undergo generation before assaying.

Each laboratory should utilize controls at several levels to monitor assay performance. The controls should be treated as unknowns. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the controls. Appropriate statistical methods should be used to evaluate trends. Acceptable performance limits should be ascertained for the individual laboratory.[22, 23]

11. RESULTS

11.1 Record the counts per minute (CPM) bound for each tube.

11.2 Plot the CPM bound for angiotensin I calibrators (vertical axis) versus nanograms (ng) of angiotensin I added per tube (horizontal axis) on semi-logarithmic graph paper.

11.3 Draw the best fitting curve. For typical data, refer to TABLE I. FIGURE 1 illustrates a typical calibrator curve.

11.4 Locate the CPM bound for each tube which corresponds to each sample on the vertical axis and follow a horizontal line intersecting the calibrator curve. At the point of intersection, read ng angiotensin I from the horizontal axis. For each sample and control, determine the average ng “37” and average ng “4”.

12. PLASMA RENIN ACTIVITY (PRA)

Plasma renin activity (PRA) is expressed as ng/mL/hr of generated angiotensin I. The following mathematical corrections are made to obtain ng/mL/hr:

12.1 Subtract the average “4” value (Background) from the average “37” (Generated):

Net ng = ng “37” – ng “4”

12.2 Size of sample assayed in coated tube (C): 0.1 mL_C

12.3 Dilution of sample (S) by generation buffer (B) and inhibitor (I):

$$\frac{(1.0\ mL_S\ +\ 0.1\ mL_B)\ +\ 0.01\ mL_I}{1.0\ mL_S} = \frac{1.11\ mL_{Final}}{1.00\ mL_{Initial}}$$

12.4 Time of angiotension I generation: 1.5 hours

NOTE: If length of generation time is altered, then the corresponding change must be made in this number.

12.5 Maleate Generation Calculation:

$$PRA = \frac{\left(\frac{ng\ "37"-\ ng\ "4"}{0.1\ mL_C}\right) \times \left(\frac{1.11\ mL}{1.00\ mL}\right)}{1.5\ hr}$$

PRA = (7.40/mL/hr) x (net ng)

Example: Patient “X” Plasma Sample:

PRA = (0.41 - 0.08) ng x (7.40/mL/hr)

PRA = 2.44 ng/mL/hr

TABLE I
Recording the Data
Do not use to calculate unknowns

Tube No.	Contents of Tubes			CPM Bound	Angiotensin I Level (ng/tube)	PRA Final (ng/mL/hr)
T_1	Total Counts (Tracer-Buffer)			29242	–	–
T_2	Total Counts (Tracer-Buffer)			28992	–	–
1	Angiotensin I Blank	0	ng/tube	13617	–	–
2	Angiotensin I Blank	0	ng/tube	13048	–	–
3	Angiotensin I Calibrator	0.02	ng/tube	13163	–	–
4	Angiotensin I Calibrator	0.02	ng/tube	12625	–	–
5	Angiotensin I Calibrator	0.08	ng/tube	11305	–	–
6	Angiotensin I Calibrator	0.08	ng/tube	11291	–	–
7	Angiotensin I Calibrator	0.3	ng/tube	6991	–	–
8	Angiotensin I Calibrator	0.3	ng/tube	7110	–	–
9	Angiotensin I Calibrator	1.0	ng/tube	3053	–	–
10	Angiotensin I Calibrator	1.0	ng/tube	3056	–	–
11	Angiotensin I Calibrator	5.0	ng/tube	1307	–	–
12	Angiotensin I Calibrator	5.0	ng/tube	1232	–	–
13	Renin Activity Control, 37°C			3149	0.97	
14	Renin Activity Control, 37°C			3053	1.01	
					Av: 0.99	
15	Renin Activity Control, 4°C			8674	0.20	
16	Renin Activity Control, 4°C			8607	0.20	
					Av: 0.20	5.85
17	Patient “X” Plasma Sample, 37°C			4362	0.41	
18	Patient “X” Plasma Sample, 37°C			4459	0.40	
					Av: 0.41	
19	Patient “X” Plasma Sample, 4°C			8546	0.08	
20	Patient “X” Plasma Sample, 4°C			8557	0.08	
					Av: 0.08	2.44

Typical Calibrator Curve
Do not use to calculate unknowns

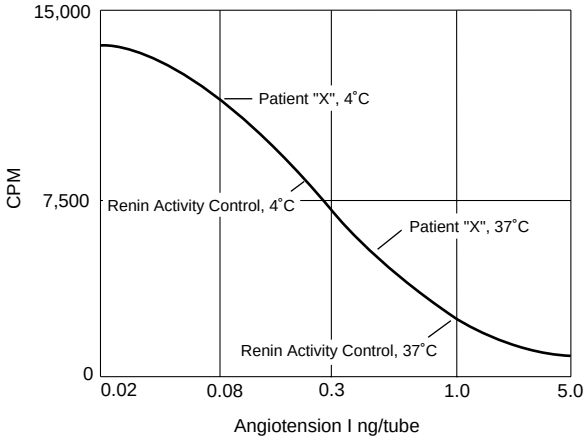


FIGURE 1

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Procedural

13.1 The coated tube plastic bag should be closed securely when storing unused tubes and maintained at 2-27°C.

13.2 The water level must be kept above that of the solution in the tubes without allowing the tubes to float.

13.3 The user should note that erroneous results can be caused by improper handling of patient samples.

13.4 Strict attention must be given to the maintenance of ice water temperature during collection and subsequent handling of samples.

13.5 Frozen samples should be thawed rapidly to room temperature and mixed thoroughly before pipetting.

13.6 Heparin has been noted to inhibit the renin reaction at concentrations of 5 IU/mL; and therefore, heparin should not be used as an anticoagulant in blood samples to be assayed for plasma renin activity.[5]

13.7 Hemolyzed specimens contain angiotensinases and should not be used.

13.8 Published data presented evidence that linearity of angiotensin I generation during a predetermined generation period, even as short as thirty minutes or as long as eighteen hours, cannot be assumed.[3] Departure from linearity may be the rule rather than the exception even under controlled buffering at any pH. It may be that factors other than pH can influence the linearity of angiotensin I generation. Until such variables are truly controllable, it seems necessary to anticipate non-linearity characteristics.

13.9 Failure to obtain appropriate control values may indicate imprecise manipulations, improper handling or deterioration of reagents. A calibrator curve based on the appropriate values for calibrators must be established for every run.

Interpretive

It is critical that physiological variables, such as the patient's posture and either sodium intake or 24-hour urinary sodium excretion, be considered for accurate interpretation of assay results. Age, sex, and race are also important factors for consideration.

Changes in PRA can be affected by a spectrum of drugs including diuretics, adrenergic blocking agents, vasodilators, anti-hypertensives, large doses of progestins, angiotensin II antagonists, oral contraceptives or estrogen therapy, and mineralocorticoid anta-gonists. Use of diatrizoate as in renography, can also affect PRA values. Failure to take into account the pharmacological contribution of the patient's drug intake may lead to the misinterpretation of PRA values.
Various clinical conditions, including normal pregnancy, affect PRA. These factors have been outlined concisely in review articles published by several investigators.[27-30]

14. EXPECTED VALUES

Clinical evaluation of this PRA kit was performed by an independent investigator, and results are summarized briefly in this section. The data presented are intended as a guide for the user of this kit. Because of variances in patient population, users are advised to establish their own data (for example, PRA vs. Sodium Excretion Nomogram).

14.1 Effect of Salt Intake

Plasma samples and 24-hour urine collections were obtained from normal adult subjects without apparent cardiovascular or renal diseases. Each subject was placed on a diet of known sodium and potassium content. After an equilibration period, plasma samples for PRA and 24-hour urine samples were obtained. The results of these studies are contained in TABLE II. The data were divided into four subgroups based on the range of sodium excretion observed: *ad libitum* salt intake (75-150 mEq/24 hrs.); salt supple-mented diet (150 mEq/24 hrs.); and two salt restricted diets. It is feasible in routine clinical circumstances to obtain modest reductions in sodium excretion, to 30-75 mEq/24 hrs. The lower range of sodium excretion, 0-30 mEq/24 hrs., is unusual and requires severe restriction of sodium intake. The predicted inverse relationship between PRA and urine sodium excretion was observed. Since dietary salt content varies regionally, it is suggested that PRA vs sodium excretion data be developed by the individual laboratory.
During the course of clinical evaluation of this kit, samples were obtained from ambulatory or hospitalized adults without apparent cardiovascular or renal disease. These subjects were on *ad libitum* salt intakes and no effort was made to control their activities. All samples were obtained between 8 AM and 10 AM. The data from these observations are contained in TABLE III. They fall within the range of PRA observed for subjects on normal salt intake for this population. The higher values of hospitalized subjects may be ascribed to dietary salt alterations imposed by institutional food, stress induced by hospital environment, or other undetermined factors.

TABLE II
PRA with Restricted Salt Intake

Na+ Excretion mEq/24 hr.	Mean ±1 S.D. (ng/mL/hr)
0 - 30	16.34 ± 7.52
30 - 75	5.91 ± 1.82
75 -150	2.12 ± 0.68
>150	0.85 ± 0.46

TABLE III
PRA with ad libitum Salt Intake

	Mean ±1 S.D. (ng/mL/hr)
Random Ambulatory Normals	1.67 ± 0.83
Non-Ambulatory Normals	3.30 ± 1.85

14.2 Positional Effect

Accurate assessment of PRA values depends on the clinician's knowledge of the subject's posture, since PRA values are affected by position. The effect of assuming an erect position after a night of supine sleep is indicated in TABLE IV.

TABLE IV
Positional Effect

	Mean ±1 S.D. (ng/mL/hr)
Supine	1.24 ± 1.09
Erect	2.63 ± 1.32

14.3 Furosemide Stimulation

Clinical assessment of the renin-angiotensin system may require evaluation of PRA change after stimulation. The effect of furosemide on the renin-angiotensin system, as detected by change in PRA, was determined as shown by a study summarized in TABLE V. There was a significant rise in PRA values with furosemide stimulation.

TABLE V
Furosemide Stimulation*

	Mean ±1 S.D. (ng/mL/hr)
Pre-stimulation	2.36 ± 1.23
Post-stimulation	6.92 ± 2.76

NOTE: A monograph detailing the entire evaluation is available upon request by contacting Customer Service. The monograph contains the results of the following studies:

1. urine aldosterone vs. PRA.
2. renal vein renin studies in patients with renovascular hypertension.
3. PRA determination in anephric patients.
4. PRA results in patients on hemodialysis.
5. renin profiling of patients with essential hypertension.

* five hrs. after furosemide, 40 mg p.o.

15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 Analytical Sensitivity

The sensitivity of the calibrator curve is defined as the smallest single value which can be distinguished from zero. A statistical estimation of the minimal detectable concentration (sensitivity) was calculated according to the method of D. Rodbard, (1978),[31] for thirty replicates at the zero point of the calibrator curve. The calculated sensitivity is 0.018 ng/tube.

15.2 Precision

The intra-run precision was determined from the mean of twenty simultaneous assays per sample. The inter-run precision was determined from the mean of the average of duplicates for twenty separate runs.

Intra-Run Precision Sample	Number of Assays	Mean (ng/mL/hr)	Standard Deviation (ng/mL/hr)	Coefficient of Variation
Plasma Pool A	20	1.6	0.16	10.0
Plasma Pool B	20	6.2	0.28	4.6
Plasma Pool C	20	17.9	1.68	9.4

Inter-Run Precision Sample	Number of Assays	Mean (ng/mL/hr)	Standard Deviation (ng/mL/hr)	Coefficient of Variation
Plasma Pool A	20	1.6	0.09	5.6
Plasma Pool B	20	10.7	0.82	7.6
Plasma Pool C	20	15.2	1.04	6.8

15.3 Avidity

The calculated affinity constant of this kit's antiserum is approximately 3×10^{10} liters/ mole.

15.4 Analytical Specificity

Data on the cross-reactivity of the antiserum used in this kit are expressed as the ratio of angiotensin I concentration to the cross-reacting substance concentration at 50% inhibition of maximum binding.

Compound	% Cross Reactivity
Angiotensin I	100
Tetradecapeptide*	0.02
Angiotensin II	<0.03
Angiotensin III	<0.03

* Synthetic renin substrate.

REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES

TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE GAMMACOAT® ACTIVITÉ DE LA RÉNINE PLASMATIQUE

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

La trousse de dosage radio-immunologique GammaCoat [^{125}I] Activité de la rénine plasmatique permet d'effectuer la détermination quantitative de l'activité de la rénine plasmatique (ARP) par dosage radio-immunologique de l'angiotensine I produite.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

La rénine, une enzyme protéolytique dont le poids moléculaire est de l'ordre de 40.000, est libérée par les cellules juxtaglomérulaires du rein. Cette enzyme agit au niveau de la circulation générale par clivage de son substrat, une alpha-2 globuline synthétisée par le foie, pour donner naissance à un décapeptide, l'angiotensine I.

L'angiotensine I est rapidement clivée sous l'effet d'une enzyme de conversion, principalement au niveau des poumons, en un octapeptide biologiquement actif, l'angiotensine II. A son tour, l'angiotensine II est rapidement dégradée en fragments peptidiques inactifs par des enzymes présentes dans le plasma et les tissus, désignées sous le nom d'angiotensinases. La voie métabolique du système rénine-angiotensine est décrite ci-dessous :

substrat de la rénine
rénine
↓
angiotensine I
enzyme de conversion
↓
angiotensine II
angiotensinases
↓
fragments peptidiques inactifs

L'angiotensine II a une demi-vie extrêmement brève *in vivo*, mais elle est le plus puissant agent vasopresseur connu. L'angiotensine II joue un rôle essentiel dans différentes formes d'hypertension, ainsi que dans la régulation de la tension artérielle. En outre, il a été démontré que l'angiotensine II est la substance ayant la plus forte influence sur la sécrétion d'aldostérone par la glande surrénale.

Les difficultés techniques associées à la mesure des concentrations en angiotensine II dans le sang ont retardé l'acceptation générale de ce dosage en laboratoire clinique. Comme les taux d'angiotensine I reflètent directement l'activité de la rénine plasmatique, la détermination de l'activité de la rénine plasmatique a été largement adoptée pour l'évaluation du système rénine-angiotensine lors de maladies. La mesure de l'activité de la rénine plasmatique chez les patients hypertendus apporte une contribution importante dans le diagnostic différentiel de l'aldostéronisme primaire et secondaire. L'estimation de l'activité de la rénine est également utile pour déterminer le pronostic et le traitement le plus approprié chez les personnes atteintes d'hypertension essentielle.

Un dosage radio-immunologique de l'angiotensine I et son application en tant qu'indice de l'activité de la rénine plasmatique ont été décrits.[1] La procédure de détermination de l'activité de la rénine plasmatique plasma au moyen de la trousse GammaCoat est adaptée de cette méthode.

3. PRINCIPES DU DOSAGE

La procédure est basée sur les principes de liaison compétitive du dosage radio-immunologique.[2] Dans la trousse de dosage radio-immunologique GammaCoat [^{125}I] Activité de la rénine plasmatique, l'anticorps est immobilisé sur la partie inférieure de la paroi du tube GammaCoat. La détermination de l'activité de la rénine plasmatique nécessite une incubation initiale du plasma pour produire de l'angiotensine I, suivie de la quantification de l'angiotensine I par dosage radio-immunologique. La production d'angiotensine I dans le système de substrat humain dépend des paramètres suivants :

3.1 pH d'incubation.

3.2 degré de dilution du plasma.

3.3 choix des inhibiteurs enzymatiques.

3.4 facteurs inconnus dans chaque échantillon individuel de plasma, par exemple la concentration en substrat de la rénine.

3.5 durée d'incubation.

3.6 température d'incubation.

pH de production

La vitesse de production de l'angiotensine I *in vitro* est fonction du pH. La procédure utilisée dans cette trousse fonctionne à un pH de production de 6,0, le pH habituel des échantillons après addition de tampon à pH 5,7. L'avantage d'une incubation à pH 6,0 plutôt qu'au pH physiologique de 7 est un doublement de la vitesse de production de l'angiotensine I qui engendre une meilleure sensibilité pour les échantillons à faible teneur en rénine.[3-14] Cette optimisation permet un raccourcissement du temps de production.

Choix de l'inhibiteur enzymatique

Un grand nombre de substances peuvent être utilisées pour inhiber la conversion enzymatique de l'angiotensine I en angiotensine II et pour empêcher la dégradation protéolytique au cours de la production d'angiotensine I.[15-17] L'inhibiteur utilisé dans cette procédure est le fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF).

Effet de la dilution du plasma

La dilution du plasma est à éviter car la réaction de la rénine est tributaire du substrat à la concentration de substrat de la rénine qui est habituellement présente dans le plasma. L'effet d'une dilution du substrat est observable à tout moment au cours de la production et cet effet est le plus marqué pour des dilutions plus importantes.[4]

Durée de production

On doit utiliser le temps le plus court possible pour la détermination de l'activité enzymatique afin d'obtenir la meilleure estimation de la vitesse initiale de la réaction et de réduire la consommation de substrat. Le dosage radio-immunologique de l'angiotensine I est suffisamment sensible pour permettre la détermination de l'activité de la rénine plasmatique sous des conditions optimisées de production d'angiotensine I à pH 6,0.

La méthode de la trousse GammaCoat Activité de la rénine plasmatique permet un temps de production réduit parce que l'échantillon de plasma est dilué au minimum, tamponné à un pH optimisé et analysé en présence d'un inhibiteur qui est efficace au pH sélectionné. On a émis l'hypothèse que des échantillons à faible concentration peuvent être quantifiés en laissant produire les échantillons pendant dix-huit heures avant de procéder au dosage.[4]

Durée du dosage radio-immunologique

La méthode de la trousse GammaCoat Activité de la rénine plasmatique utilise une incubation de trois heures pour le dosage radio-immunologique. Les résultats sont disponibles dans la journée.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tubes enduits d'anticorps anti-angiotensine I de lapin	1 sac / 100 tubes	5 sacs / 100 tubes
Tampon pour dosage de l'angiotensine (11x)	1 flacon / 10 ml	5 flacons / 10 ml
Tampon maléate pour la production d'angiotensine	1 flacon / 5 ml	3 flacons / 5 ml
PMSF pour angiotensine	1 flacon / 1 ml	2 flacons /1 ml
Contrôle de l'activité de la rénine	1 flacon / 3 ml	2 flacons / 3 ml
Etalons Angiotensine (A-F)	6 flacons / 2 ml	12 flacons / 2 ml
Traceur Angiotensine	2 flacons / 5 ml	10 flacons / 5 ml
Nombre de dosages	100	500

CONSERVATION : Dès réception, la trousse doit être stockée entre 2 et 8°C. Après ouverture, conserver chaque réactif comme indiqué ci-dessous. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette. La date de péremption de la trousse figure sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Traceur Angiotensine I [^{125}I] : réactif lyophilisé
Reconstituer le flacon de traceur Angiotensine I [^{125}I] en y ajoutant 5 ml d'eau purifiée. Bien mélanger en retournant le flacon ou en le mélangeant délicatement au vortex. Ajouter le contenu de **deux** flacons de traceur à 100 ml de tampon de dosage. Le réactif tampon+traceur est stable entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption de la trousse.
Après reconstitution, chaque flacon contient environ 1 µCi de traceur (<1 µg/ml d'angiotensine I) dans 5 ml de solution saline de tampon phosphate contenant de la sérumalbumine bovine avec du thimérosal comme conservateur.

4.2 Tubes enduits de sérum anti-angiotensine I de lapin : réactif prêt à l'emploi
Les tubes de 12 x 75 mm sont enduits de sérum anti-angiotensine I de lapin (titre <1 µg/tube) et emballées dans une poche plastique. Les conserver entre 2 et 27°C.

4.3 Tampon concentré pour dosage de l'angiotensine (11X) : réactif concentré
Ajouter la totalité du contenu du flacon de tampon de dosage concentré à 100 ml d'eau purifiée et bien mélanger. Chaque flacon contient 10 ml de tampon phosphate avec 0,1% d'azoture de sodium comme conservateur.

4.4 Tampon maléate pour la production d'angiotensine : réactif prêt à l'emploi
Chaque flacon contient 5 ml de tampon maléate, EDTA sodique, sulfate de néomycine et colorant bleu inerte avec 0,1% d'azoture de sodium comme conservateur.

4.5 Fluorure de phénylméthylsulfonyle pour angiotensine : réactif prêt à l'emploi
Chaque flacon contient 1 ml de fluorure de phénylméthylsulfonyle fluoride (PMSF) dans de l'éthanol.

4.6 Contrôle de l'activité de la rénine : réactif lyophilisé
Reconstituer avant l'emploi en pipetant 3,0 ml d'eau purifiée entre 2 et 8°C. Placer le flacon dans un bain de glace pendant 10 minutes et mélanger délicatement au vortex ou agiter pour bien mélanger. Répartir en portions de 1,0 ml portions dans des tubes en verre ou en plastique préalablement refroidis. Fermer hermétiquement et conserver à
-20°C. On peut conserver un aliquot dans un bain de glace ou au réfrigérateur entre 2 et 8°C si le dosage a lieu immédiatement.
Le contrôle reconstitué doit être congelé à -20°C et est stable pendant au moins deux mois. La décongélation doit s'effectuer dans un bain de glace ou au réfrigérateur entre 2 et 8°C et le contrôle reconstitué ne peut **pas** être recongelé après décongélation.

Des variations de l'activité de la rénine plasmatique ont été observées lors du dosage répété de plasma congelé après différentes durées de stockage.[19,20] Par conséquent, l'utilisation de plasma congelé comme contrôle lors de la détermination de l'activité de la rénine plasmatique risque de fournir des résultats non fiables. Le contrôle d'activité de la rénine est utilisé en routine lors de la **production** d'angiotensine I, ainsi que lors du dosage radio-immunologique et fournit un indice de contrôle de qualité fiable pour l'ensemble du dosage. Se reporter à la section Contrôle de qualité pour plus d'informations.
Après reconstitution, chaque flacon contient 3 ml de sérum humain traité contenant 0,1% d'azoture de sodium.

4.7 Etalons angiotensine I (A-F) : réactif lyophilisé
REMARQUE : Les blancs et les étalons sont utilisés **uniquement** au cours de l'étape de dosage radio-immunologique et **ne doivent pas** subir la production d'angiotensine I. Reconstituer chaque flacon avec 2,0 ml d'eau purifiée et bien mélanger avant utilisation. Les blancs et les étalons doivent ensuite être refroidis dans un bain de glace avant le dosage. On peut les conserver entre 2 et 8°C pendant un maximum de deux semaines et à -20°C pendant de plus longues périodes.

Après reconstitution, chaque flacon contient 2 ml d'angiotensine I, BSA dans une solution saline de tampon phosphate. Les étalons sont calibrés à 0 ; 0,2 ; 0,8 ; 3,0 ; 10,0 et 50,0 ng/ml respectivement. Les étalons d'activité de la rénine plasmatique DiaSorin sont calibrés au moyen du lot de production de référence actuel. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique *in vitro*, comme recommandé.

5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.
Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

REACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Les traiter comme potentiellement infectieux.
Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif pour la présence d'antigène HBsAg, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1 et 2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquels il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B, du virus de l'hépatite C (VHC), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document des Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 4ème édition, mai 1999 ou dernière édition.

REACTIFS CONTENANT DE L'AZOTURE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium. L'azoture de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et donner naissance à des azotures fortement explosifs. Lors de leur élimination, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azoture. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" dans le manuel Guide-Safety Management N° CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA,1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/CE)
R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.
R 32 - Un contact avec les acides dégage un gaz très toxique.
S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

REACTIFS CONTENANT DU THIMEROSAL

Certains réactifs de cette trousse contiennent du thimérosal, lequel contient un composé à base de mercure. L'élimination du mercure élémentaire, du mercure inorganique, des oxydes de mercure et des composés à base de mercure doit se faire conformément à toutes les réglementations locales, régionales et fédérales.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme responsable d'anomalies congénitales ou d'autres dommages intéressant la reproduction.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

Réactifs contenant de l'éthanol

R11 - Hautement inflammable.
S16 - Tenir à l'écart de sources d'inflammation — Interdiction de fumer.
S43 - En cas d'incendie, utiliser une poudre extinctrice ou du gaz carbonique.

Réactifs contenant du PMSF

R23/24/25 - Toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.
S36 - Porter des vêtements de protection adaptés.
S45 - En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

Réactifs contenant de l'hydroxyde de potassium

R35 - Provoque de graves brûlures.
S26 - En cas de contact oculaire, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin.
S37/39 - Portez des gants et des lunettes/un masque de protection adaptés.

REACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 2 µCi (74 kBq – trousse CA-1533) ou 10 µCi (370 kBq – trousse CA-1553) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées pour la conservation, la manipulation et l'élimination de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de la médecine vétérinaire, des laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont soumis aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'état avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans son récipient d'origine à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'une produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de le laver avec les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et l'élimination de produits radioactifs sont soumis aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité indiquée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle indiquée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

6. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

L'activité de la rénine plasmatique est maximale le matin en raison des variations diurnes de la libération de rénine et les échantillons doivent être systématiquement prélevés à ce moment.[18,19] Un échantillon de sang veineux est prélevé de manière aseptique au moyen d'un tube en verre sous vide contenant de l'EDTA. Les échantillons peuvent être prélevés, transportés et centrifugés à température ambiante. Le sang peut demeurer à température ambiante pendant jusqu'à six heures avant d'être centrifugé sans qu'il y ait d'accumulation significative d'angiotensine I. Après centrifugation du sang, le plasma peut être congelé jusqu'au moment du dosage. Les échantillons peuvent être congelés à -20°C pendant un maximum d'un mois. Les cycles répétés de congélation-décongélation, tels qu'ils peuvent se produire dans des congélateurs à dégivrage automatique, doivent être évités. Des variations de l'activité de la rénine plasmatique ont été observées tant suite au stockage entre 2 et 8°C qu'après un stockage prolongé à -20°C.[20, 21]

Avant le dosage, décongeler rapidement les échantillons congelés à température ambiante.

Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques, ictériques ou citratés. Ne pas utiliser d'héparine comme anticoagulant. Voir la section Limites du dosage pour des précautions et des informations supplémentaires.

7. MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS

7.1 Eau purifiée.

7.2 Bain-marie à température constante à 37 ± 2°C.

7.3 Bain de glace.

7.4 Pipettes volumétriques (1, 2, 3 et 5 ml).

7.5 Cylindre gradué (100 ml).

7.6 Pipettes de précision (10, 100, 500 et 1000 µl).

7.7 Compteur gamma.

7.8 Tubes en plastique ou en verre de 12 x 75 mm (pour la production d'angiotensine I).

7.9 Portoirs pour tubes à essai.

7.10 Agitateur-mélangeur de type vortex (facultatif).

7.11 Aspirateur d'eau (facultatif).

7.12 Papier absorbant doublé d'une pellicule plastique (facultatif).

8. PROCÉDURE DE PRODUCTION D'ANGIOTENSINE I

8.1 Transférer 1,0 ml de plasma dans un tube en verre ou en plastique **non enduit** marqué du numéro d'identification et du suffixe 37.

8.2 Ajouter 10 µl de solution de PMSF et 100 µl de tampon de production maléate (pH 6,0) à chaque aliquot de 1,0 ml de l'étape 1. Bien mélanger et placer dans un bain de glace.

8.3 Transférer 500 µl du plasma de l'étape 2 dans un tube réfrigéré correspondant marqué du suffixe 4.

8.4 Placer la série de tubes 37 dans un bain-marie à 37°C. Laisser la série de tubes 4 dans un bain de glace. Laisser se dérouler la production en tampon maléate pendant 90 minutes.

On a émis l'hypothèse que des échantillons de patient ayant des valeurs de l'activité de la rénine plasmatique inférieures à 1,0 ng/ml/h pouvaient être incubés pendant dix-huit heures pour la production, puis dosés à nouveau.[4] Les calculs doivent être ajustés pour toute modification du temps de production.

8.5 A la fin de la période de production, transférer la série d'échantillons 37 soit dans un bain de glace si le dosage doit avoir lieu immédiatement, soit au congélateur avec les tubes de la série 4 en vue d'un dosage ultérieur.

9. PROCÉDURE DE DOSAGE

La procédure de dosage comprend la préparation de la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la teneur en angiotensine I à déterminer dans les échantillons des séries 37 et 4 est interpolée. On soustrait ensuite le bruit de fond (série 4) des tubes de production de la série 37 correspondants.

9.1 Laisser le réactif traceur-tampon s'équilibrer à température ambiante et bien mélanger avant utilisation. Garder les blancs et les étalons, les contrôles de production et les échantillons de patients après production dans un bain de glace et bien mélanger avant utilisation.

9.2 Etiqueter une série de tubes GammaCoat par paires selon le schéma suivant. Des tubes Activité totale [T_1,T_2] et B_0 [1, 2] peuvent s'avérer nécessaires pour certains programmes de traitement de données, mais peuvent être omis si l'on trace la courbe d'étalonnage sur papier semi-logarithmique.[23-25]

Tube n°	Contenu des tubes			Code alphabétique	Angiotensine I (ng/0,1 ml)
T_1,T_2	Activité totale (traceur-tampon)				
1, 2	Blanc Angiotensine I	0	ng/ml	A	0
3, 4	Etalon Angiotensine I	0,2	ng/ml	B	0,02
5, 6	Etalon Angiotensine I	0,8	ng/ml	C	0,08
7, 8	Etalon Angiotensine I	3,0	ng/ml	D	0,30
9,10	Etalon Angiotensine I	10,0	ng/ml	E	1,0
11,12	Etalon Angiotensine I	50,0	ng/ml	F	5,0
13,14	Contrôle de l'activité de la rénine, production à 37°C				
15,16	Contrôle de l'activité de la rénine, production à 4°C				
17,18	Patient "X", production à 37°C				
19, 20	Patient "X", production à 4°C				

9.3 Pipeter dans les paires de tubes appropriées :

a. 100 µl de blanc ou d'étalon Angiotensine I.

b. 100 µl du contrôle de l'activité de la rénine de la série de production "37" et "4" dans la série de tubes 4 correspondante.

c. 100 µl d'échantillon patient de la série de production "37" et "4" dans la série de tubes 4 correspondante.

9.4 Ajouter immédiatement 1,0 ml de réactif traceur-tampon dans chaque tube, y compris les tubes Activité totale. Mélanger les réactifs en agitant délicatement chaque tube au vortex.

9.5 Incuber tous les tubes à température ambiante (20 à 27°C) pendant trois heures.

9.6 Aspirer ou décanter tous les tubes, à l'exception de l'activité totale.

UNE ÉLIMINATION INCOMPLÈTE DE LA SOLUTION ADHÉRANT AUX PAROIS RISQUE D'ENGENDRER UNE MAUVAISE REPRODUCTIBILITÉ OU DES VALEURS ERRONÉES.

Si l'on utilise la technique par aspiration, s'assurer que l'embout en plastique de l'aspirateur est en contact avec le fond de l'éprouvette enduite et que tout le liquide est bien éliminé.

Si l'on utilise la technique par décantation, laisser les tubes à l'envers pendant 3 à 5 minutes afin qu'ils se vident bien. Tapoter les tubes sur du papier absorbant pour éliminer le liquide qui y adhère avant de replacer les tubes à l'endroit.

9.7 Compter tous les tubes dans un compteur gamma pendant une minute, la fenêtre étant correctement réglée pour l'iode-125.

9.8 Calculer les résultats. Se reporter à la section Résultats.

10. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle de l'activité de la rénine est joint à la trousse. Consulter l'étiquette du flacon pour connaître la valeur nominale. Le contrôle doit être soumis à l'étape de production avant le dosage.

Chaque laboratoire doit appliquer des contrôles à plusieurs niveaux pour vérifier les performances du dosage. Les contrôles doivent être traités comme des valeurs à déterminer. Des diagrammes de contrôle de qualité doivent être conservés pour suivre les performances des contrôles. Des méthodes statistiques appropriées doivent être utilisées pour évaluer les tendances. Chaque laboratoire doit établir ses propres limites de performances acceptables.[22, 23]

11. RÉSULTATS

11.1 Enregistrer le nombre de coups par minute (CPM) liés de chaque tube.

11.2 Reporter les CPM liés pour les étalons d'angiotensine I (axe vertical) en fonction du nombre de nanogrammes (ng) d'angiotensine I ajoutés par tube (axe horizontal) sur du papier semi-logarithmique.

11.3 Tracer la courbe la plus précise possible. Pour un exemple de données typiques, se reporter au TABLEAU I. La FIGURE 1 illustre une courbe d'étalonnage typique.

11.4 Indiquer les CPM liés pour chaque tube correspondant à chaque échantillon sur l'axe vertical et suivre une ligne horizontale jusqu'au point d'intersection avec la courbe d'étalonnage. Au point d'intersection, lire le nombre de nanogrammes d'angiotensine I sur l'axe horizontal. Pour chaque échantillon et chaque contrôle, déterminer le nombre moyen de nanogrammes "37" et le nombre moyen de nanogrammes "4".

12. ACTIVITÉ DE LA RÉNINE PLASMATIQUE (ARP)

L'activité de la rénine plasmatique (ARP) est exprimée en ng/ml/h d'angiotensine I produite. Les corrections mathématiques suivantes sont effectuées pour obtenir des ng/ml/h :

12.1 Soustraire la valeur moyenne "4" (bruit de fond) de la valeur moyenne "37" (production) :

ng net = ng "37" – ng "4"

12.2 Taille de l'échantillon dosé en tube enduit (C): 0,1 ml_C

12.3 Dilution de l'échantillon (S) par le tampon de production (B) et l'inhibiteur (I) :

$$\frac{(1{,}0\ ml_S + 0{,}1 ml_B) + 0{,}01 ml_I}{1{,}0\ ml_S} = \frac{1{,}11 ml_{Final}}{1{,}00\ ml_{Initial}}$$

12.4 Temps de production de l'angiotensine I : 1,5 heures

REMARQUE : En cas de modification du temps de production, ce chiffre doit être modifié en conséquence.

12.5 Calcul de la production en tampon maléate :

$$PRA = \frac{\left(\frac{ng\ "37" - ng\ "4"}{0{,}1\,ml_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11\,ml}{1{,}00\,ml}\right)}{1{,}5\ heures}$$

PRA = (7,40/ml/h) x (ng net)

Exemple : Echantillon de plasma du patient "X" :

PRA = (0,41 - 0,08) ng x (7,40/ml/h)

PRA = 2,44 ng/ml/h

TABLEAU I
Enregistrement des données
A ne pas utiliser pour calculer les valeurs à déterminer

Tube n°	Contenu des tubes	CPM liés	Niveau d'angiotensine I (ng/tube)	ARP finale (ng/ml/h)
T_1	Activité totale (traceur-tampon)	29242	–	–
T_2	Activité totale (traceur-tampon)	28992	–	–
1	Blanc Angiotensine I 0 ng/tube	13617	–	–
2	Blanc Angiotensine I 0 ng/tube	13048	–	–
3	Etalon Angiotensine I 0,02 ng/tube	13163	–	–
4	Etalon Angiotensine I 0,02 ng/tube	12625	–	–
5	Etalon Angiotensine I 0,08 ng/tube	11305	–	–
6	Etalon Angiotensine I 0,08 ng/tube	11291	–	–
7	Etalon Angiotensine I 0,3 ng/tube	6991	–	–
8	Etalon Angiotensine I 0,3 ng/tube	7110	–	–
9	Etalon Angiotensine I 1,0 ng/tube	3053	–	–
10	Etalon Angiotensine I 1,0 ng/tube	3056	–	–
11	Etalon Angiotensine I 5,0 ng/tube	1307	–	–
12	Etalon Angiotensine I 5,0 ng/tube	1232	–	–
13	Contrôle de l'activité de la rénine, 37°C	3149	0,97	
14	Contrôle de l'activité de la rénine, 37°C	3053	1,01	
			Moy : 0,99	
15	Contrôle de l'activité de la rénine, 4°C	8674	0,20	
16	Contrôle de l'activité de la rénine, 4°C	8607	0,20	
			Moy : 0,20	5,85
17	Echantillon de plasma du patient "X", 37°C	4362	0,41	
18	Echantillon de plasma du patient "X", 37°C	4459	0,40	
			Moy : 0,41	
19	Echantillon de plasma du patient "X", 4°C	8546	0,08	
20	Echantillon de plasma du patient "X", 4°C	8557	0,08	
			Moy : 0,08	2,44

Courbe d'étalonnage typique
A ne pas utiliser pour calculer les valeurs à déterminer

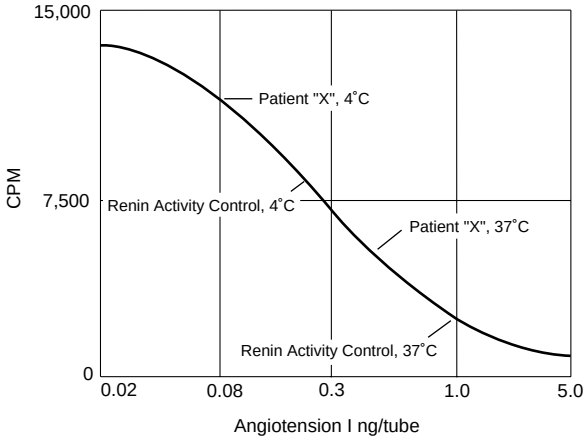


FIGURE 1

13. LIMITES DU DOSAGE

Au niveau de la procédure

13.1 Le sac en plastique contenant les tubes enduits doit être soigneusement refermé pour conserver les tubes non utilisés et maintenu à une température de 2 à 27°C.

13.2 Le niveau d'eau doit être maintenu au-dessus du niveau de la solution dans les tubes, mais sans que les tubes ne flottent.

13.3 L'utilisateur doit garder en mémoire qu'une manipulation des échantillons de patients peut engendrer des résultats erronés.

13.4 On accordera une attention toute particulière au maintien de la température du bain de glace au cours du prélèvement et de la manipulation ultérieure des échantillons.

13.5 Les échantillons congelés doivent être décongelés rapidement à température ambiante et bien mélangés avant de les pipeter.

13.6 On a constaté que l'héparine inhibe la réaction de la rénine à des concentrations de 5 UI/ml ; par conséquent, on ne doit pas utiliser d'héparine comme anticoagulant pour les échantillons de sang destinés au dosage de l'activité de la rénine plasmatique.[5]

13.7 Les échantillons hémolysés contiennent des angiotensinases et ne doivent pas être utilisés.

13.8 Les données publiées indiquent qu'il n'est pas possible d'affirmer la linéarité de la production d'angiotensine I au cours d'une période de production déterminée, même aussi brève que trente minutes ou aussi longue que dix-huit heures.[3] Un écart par rapport à la linéarité pourrait bien être la règle plutôt qu'une exception, même dans des conditions tampon contrôlées à n'importe quel pH. Il pourrait y avoir d'autres facteurs que le pH susceptibles d'influencer la linéarité de la production d'angiotensine I. Aussi longtemps que ces variables ne sont pas parfaitement contrôlables, il semble nécessaire de s'attendre à des caractéristiques non linéaires.

13.9 Si l'on ne parvient pas à obtenir des valeurs correctes pour les contrôles, la manipulation a peut-être été imprécise ou incorrecte ou les réactifs ont pu être endommagés. Une courbe d'étalonnage basée sur les valeurs adéquates des étalons doit être établie pour chaque dosage.

Au niveau de l'interprétation

Il est essentiel de prendre en considération des variables physiologiques comme la position du patient et sa consommation de sodium ou son excrétion urinaire de sodium en 24 heures pour une interprétation exacte des résultats du dosage. L'âge, le sexe et la race sont également d'importants facteurs dont il faut tenir compte.

L'activité de la rénine plasmatique peut varier sous l'effet d'un grand nombre de médicaments, notamment les diurétiques, les inhibiteurs des récepteurs adrénergiques, les vasodilatateurs, les anti-hypertenseurs, les progestagènes à forte dose, les antagonistes de l'angiotensine II, les contraceptifs oraux ou un traitement aux oestrogènes et les antagonistes des minéralocorticoïdes. L'utilisation de diatrizoate, par exemple lors d'une rénographie, peut également affecter les valeurs de l'activité de la rénine plasmatique. Si l'on omet de prendre en considération la contribution pharmacologique des médicaments que prend le patient, cela risque d'aboutir à une interprétation incorrecte des valeurs de l'activité de la rénine plasmatique.

Diverses conditions cliniques, y compris une grossesse normale, affectent l'activité de la rénine plasmatique. Ces facteurs ont été brièvement décrits dans des articles de revue publiés par divers chercheurs.[27-30]

14. VALEURS DE RÉFÉRENCE

L'évaluation clinique de cette trousse APR a été réalisée par un chercheur indépendant et les résultats sont brièvement résumés dans cette section. Les données présentées sont destinées à servir de guide à l'utilisateur de cette trousse. En raison de la variabilité parmi les populations de patient, il est conseillé aux utilisateurs de déterminer leurs propres données (par exemple nomogramme de l'activité de la rénine plasmatique en fonction de l'excrétion de sodium par le patient).

14.1 Effet de la consommation de sel

Des échantillons de plasma et d'urine de 24 heures ont été obtenus chez des sujets adultes normaux exempts de toute pathologie cardio-vasculaire ou rénale manifeste. Chaque sujet a été soumis à un régime alimentaire à teneur connue en sodium et en potassium. Après une période d'équilibrage, des échantillons de plasma pour la détermination de l'activité de la rénine plasmatique et d'urine de 24 heures ont été obtenus. Les résultats de ces études sont résumés au TABLEAU II. Les données ont été divisées en quatre sous-groupes en fonction du niveau d'excrétion sodée observé : consommation de sel *ad libitum* (75 à 150 mEq/24 h), régime complémenté en sel (150 mEq/24 h) et deux régimes à teneur limitée en sel. Il est possible, dans des conditions cliniques normales, d'obtenir de légères réductions de l'excrétion de sodium, jusqu'à 30 à 75 mEq/24 h. Le plus faible niveau d'excrétion de sodium, 0 à 30 mEq/24 h, est inhabituel et nécessite une limitation sévère de la consommation de sodium. La relation inverse attendue entre l'activité de la rénine plasmatique et l'excrétion urinaire de sodium a été observée. Comme la teneur en sel dans le régime alimentaire varie selon les régions, il est conseillé à chaque laboratoire d'établir ses propres données de l'activité de la rénine plasmatique en fonction de l'excrétion de sodium.

Au cours de l'évaluation clinique de cette trousse, des échantillons ont été obtenus de sujets adultes ambulatoires ou hospitalisés exempts de toute pathologie cardio-vasculaire ou rénale manifeste. Ces sujets consommaient du sel *ad libitum* et aucune tentative n'a eu lieu en vue de contrôler leurs activités. Tous les échantillons ont été prélevés entre 8 heures et 10 heures du matin. Les données résultant de ces observations sont reprises au TABLEAU III. Elle se situent dans la plage d'activité de la rénine plasmatique observée pour des sujets ayant des apports normaux en sel parmi cette population. Les valeurs plus élevées chez les sujets hospitalisés peuvent être attribuées aux modifications des apports alimentaires de sel imposés par la nourriture distribuée en milieu hospitalier, au stress induit par l'environnement hospitalier ou à d'autres facteurs indéterminés.

TABLEAU II
Activité de la rénine plasmatique avec consommation limitée de sel

Excrétion de Na+ mEq/24 h	Moyenne ± 1 E.T. (ng/ml/h)
0 - 30	16,34 ± 7,52
30 - 75	5,91 ± 1,82
75 - 150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

TABLEAU III
Activité de la rénine plasmatique avec consommation de sel à volonté

	Moyenne ± 1 E.T. (ng/ml/h)
Sujets normaux ambulatoires pris au hasard	1,67 ± 0,83
Sujets normaux non ambulatoires	3,30 ± 1,85

14.2 Effet de la position
Une évaluation correcte des valeurs de l'activité de la rénine plasmatique nécessite que le clinicien connaisse la position du sujet, car les valeurs de l'APR sont affectées par la position. L'effet de supposer une position debout après une nuit de sommeil en position couchée est décrit au TABLEAU IV.

TABLEAU IV
Effet de la position

	Moyenne ± 1 E.T. (ng/ml/h)
Couché	1,24 ± 1,09
Debout	2,63 ± 1,32

14.3 Stimulation par la furosémide
L'évaluation clinique du système rénine-angiotensine nécessite éventuellement une évaluation de la variation de l'activité de la rénine plasmatique suite à une stimulation. L'effet de la furosémide sur le système rénine-angiotensine, détecté par la variation de l'activité de la rénine plasmatique, a été déterminé comme suit par une étude résumée au TABLEAU V. On observe une augmentation significative des valeurs de l'activité de la rénine plasmatique après stimulation par la furosémide.

TABLEAU V
Stimulation par la furosémide*

	Moyenne ± 1 E.T. (ng/ml/h)
Avant stimulation	2,36 ± 1,23
Après stimulation	6,92 ± 2,76

REMARQUE : Une monographie décrivant en détail l'ensemble de l'évaluation peut être obtenue sur demande en contactant notre service clientèle. Cette monographie reprend les résultats des études suivantes :

1. aldostérone urinaire vs. activité de la rénine plasmatique.
2. études de la rénine au niveau de la veine rénale chez des patients souffrant d'hypertension rénovasculaire.
3. Détermination de l'activité de la rénine plasmatique chez des patients anéphriques.
4. Résultats de l'activité de la rénine plasmatique chez des patients sous hémodialyse.
5. profil de la rénine chez des patients atteints d'hypertension essentielle.

* cinq heures après furosémide 40 mg per os.

15. CRITÈRES DE QUALITÉ

15.1 Sensibilité analytique

La sensibilité de la courbe d'étalonnage est définie comme la plus petite valeur unique pouvant être distinguée de zéro. Une estimation statistique de la concentration minimum détectable (sensibilité) a été calculée selon la méthode de D. Rodbard, (1978),[31] pour trente répétitions au point zéro de la courbe d'étalonnage. La sensibilité calculée est de 0,018 ng/tube.

15.2 Précision

La précision intra-dosage a été déterminée en calculant la moyenne de vingt dosages simultanés par échantillon. La précision inter-dosage a été déterminée en calculant la moyenne des doubles pour vingt dosages différents.

Echantillon pour la détermination de la précision intra-dosage	Nombre de dosages	Moyenne (ng/ml/h)	Ecart-type (ng/ml/h)	Coefficient de variation
Pool de plasmas A	20	1,6	0,16	10,0
Pool de plasmas B	20	6,2	0,28	4,6
Pool de plasmas C	20	17,9	1,68	9,4

Echantillon pour la détermination de la précision inter-dosage	Nombre de dosages	Moyenne (ng/ml/h)	Ecart-type (ng/ml/h)	Coefficient de variation
Pool de plasmas A	20	1,6	0,09	5,6
Pool de plasmas B	20	10,7	0,82	7,6
Pool de plasmas C	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Avidité

La constante d'affinité calculée de l'antisérum utilisé dans cette trousse est d'environ 3×10^{10} litres/mole.

15.4 Spécificité analytique

Les données concernant la réactivité croisée de l'antisérum utilisé dans cette trousse sont exprimées comme le rapport entre la concentration d'angiotensine I et la concentration de la substance présentant une réaction croisée à 50% d'inhibition de la liaison maximum.

Composé	% de réactivité croisée
Angiotensine I	100
Tétradecapeptide*	0,02
Angiotensine II	<0,03
Angiotensine III	<0,03

* Substrat synthétique de la rénine.

CONSULTER LA DERNIÈRE PAGE POUR LES RÉFÉRENCES

GAMMACOAT® PLASMA-RENIN AKTIVITÄT RADIOIMMUNOASSAY KIT

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR *IN-VITRO* DIAGNOSTIK.

Der GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity Radioimmunoassay Kit dient der quantitativen Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) mit dem Radioimmunoassay des generierten Angiotensin I.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Renin, ein proteolytisches Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 40,000 wird von den juxtaglomerulären Zellen der Niere freigesetzt. Das Enzym wirkt im Körperkreislauf und spaltet sein Substrat, ein von der Leber aufgebautes Alpha-2 Globulin, um das Dekapeptid Angiotensin I zu produzieren.

Angiotensin I wird schnell durch die Aktivität der Converting Enzyme, vornehmlich in den Lungen, in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II gespalten. OriginAngiotensin II wird wiederum durch die im Plasma und in den Geweben vorhandenen Enzyme, die als Angiotensinasen bekannt sind, schnell in inaktive Peptid - Fragmente abgebaut. Der metabolische Leitweg des Renin-Angiotensin-Systems wird auf folgende Weise beschrieben:

Reninsubstrat
Renin
↓
Angiotensin I
Converting Enzyme
↓
Angiotensin II
Angiotensinasen
↓
Inaktive Peptide - Fragmente

Angiotensin II hat eine äußerst kurze *In-vitro* Halbwertzeit, ist jedoch einer der bekanntesten Vasodepressoren. Angiotensin II spielt eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Formen von Hypertonie und bei der Blutdruckregulierung. Zusätzlich wird Angiotensin II besonders für die Beeinflussung der Aldosteronsekretion durch die Nebenniere eingesetzt.

Technische Schwierigkeiten bei der Messung des Angiotensin II - Spiegels im Blut haben die allgemeine Annahme des Assays durch die klinischen Laboratorien verzögert. Da die Angiotensin I - Spiegel direkt die Plasma-Renin-Aktivität widerspiegeln, wurde die Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität weitgehend für die Untersuchung des Renin-Angiotensin-Systems im Krankheitsfall herangezogen. Die Messung der Plasma-Renin-Aktivität bei hohem Blutdruck ist eine wichtige Hilfe bei der Differentialdiagnose des primarären und sekundaräre Aldosteronismus. Die Bewertung der Reninaktivität ist auch wertvoll bei der Festlegung der Prognose und der geeignetsten Therapie bei Patienten mit essentieller Hypertonie.

Ein Radioimmunoassay für Angiotensin I und seine Anwendung als Index der Plasma-Renin-Aktivität wurde bereits beschrieben.[1] Das Verfahren des GammaCoat Kit zur Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität wurde von dieser Methode abgeleitet.

3. TESTPRINZIPIEN

Das Verfahren basiert auf den Prinzipien der kompetitiven Bindung des Radioimmunoassays.[2] Bei dem GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity RIA Kit wird der Antikörper auf der unteren Innenwand des GammaCoat-Röhrchens immobilisiert. Die PRA-Bestimmung umfasst eine initiale Plasmainkubation zur Erzeugung von Angiotensin I, der eine Maßanalyse des Angiotensin I mittels Radioimmunoassay folgt. Die Ausschüttung von Angiotensin I im menschlichen Substratsystem wird geregelt durch:

- **3.1** pH der Inkubation.
- **3.2** Umfang der Plasmaverdünnung.
- **3.3** Wahl der Enzyminhibitoren.
- **3.4** unbekannte Faktoren in jeder individuellen Plasmaprobe wie z.B. die Konzentration des Reninsubstratspiegels.
- **3.5** Inkubationsdauer.
- **3.6** Inkubationstemperatur.

pH Generation
Die *In-vitro* Generationsrate von Angiotensin I hängt von der pH-Konzentration ab. Dieses Kit-Verfahren verwendet eine pH-Generation von 6,0, die normale pH-Konzentration von Proben nach Zugabe eines pH 5,7-Puffers. Der Vorteil einer Inkubation mit pH 6,0 statt der physiologischen pH 7 Konzentration ist die zweifach höhere Generationsrate von Angiotensin I mit der entsprechenden besseren Sensitivität für Proben mit niedrigem Reningehalt.[3-14] Als Ergebnis der Optimierung können kürzere Generationszeiten verwendet werden.

Auswahl der Enzyminhibitoren
Eine Vielzahl von Wirkstoffen kann für die Hemmung der enzymatischen Konversion des Angiotensin I in Angiotensin II eingesetzt werden und zur Verhinderung des proteolytischen Abbaus von Angiotensin I während der Generation.[15-17] Als Hemmstoff wird bei dieser Methode Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) eingesetzt.

Auswirkungen der Plasmaverdünnung.
Plasmaverdünnung sollte vermieden werden, da die Renin-Reaktion von der normalerweise im Plasma vorhandenen Konzentration des Reninsubstrats abhängig ist. Die Auswirkungen der Substratverdünnung können während der Generation in allen Intervallen beobachtet werden und treten bei höherer Verdünnung noch stärker hervor.[4]

Generationsdauer
Die Enzymtätigkeit sollte in der kürzest möglichen Zeit bestimmt werden, um die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion einschätzen und den Substratverbrauch minimieren zu können. Der Radioimmunoassay für Angiotensin I ist ausreichend empfindlich für die PRA - Bestimmung mithilfe optimierter Generationsbedingungen für Angiotensin I mit pH 6,0.
Das Verfahren des GammaCoat Plasma Renin Activity Kit bietet eine reduzierte Generationszeit, da die Plasmaprobe nur geringfügig verdünnt und auf einem optimierten pH-Wert gepuffert wird und der Test mit einem Hemmstoff abläuft, der in dem gewählten pH-Bereich wirksam ist. Es wird empfohlen, Proben mit niedrigem Spiegel durch Generieren der Proben für achtzehn Stunden zu quantifizieren und anschließend zu testen. [4]

Dauer des Radioimmunoassays
Die Methode des GammaCoat Plasma Renin Activity Kit verwendet eine dreistündige Radioimmunoassay - Inkubation. Ergebnisse können am gleichen Arbeitstag erzielt werden.

4. KITREAGENZIEN

Hase - Anti-Angiotensin I beschichtete Röhrchen	1 Beutel/100 Röhrchen	5 Beutel/100 Röhrchen
Angiotensin - Testpuffer (11x)	1 Fläschchen / 10 ml	5 Fläschchen / 10 ml
Angiotensin Maleinat - Generationspuffer	1 Fläschchen / 5 ml	3 Fläschchen/ 5 ml
Angiotensin PMSF	1 Fläschchen / 1 ml	2 Fläschchen/1 ml
Reninaktivität - Kontrolle	1 Fläschchen / 3 ml	2 Fläschchen / 3 ml
Angiotensin-Kalibratoren (A-F)	6 Fläschchen / 2 ml	12 Fläschchen / 2 ml
Angiotensin - Tracer	2 Fläschchen/ 5 ml	10 Fläschchen/ 5 ml
Anzahl der Tests	100	500

LAGERUNG: Der Kit sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Nach dem Öffnen jedes Reagenz entsprechend den u.a. Anleitungen lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 [^{125}I] Angiotensin I Tracer: lyophilisiertes Reagenz
Das Fläschchen [^{125}I] Angiotensin I Tracer mit 5 ml destilliertem Wasser verdünnen. Durch Umdrehen gut mischen oder das Fläschchen vorsichtig vortexen. Den Inhalt von **zwei** Fläschchen Tracer zu 100 ml Testpuffer zugeben. Das Tracer-Puffer Reagenz bleibt bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits stabil.
Nach der Rekonstitution enthält jedes Fläschchen ca. 1 µCi Tracer (<1 µg/ml Angiotensin I) in 5 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit bovinem Serumalbumin mit Thimerosal als Konservierungsmittel.

4.2 Mit Hase-Anti-Angiotensin I Serum beschichtete Röhrchen: gebrauchsfertiges Reagenz
12 x 75 mm Röhrchen sind mit Hase-Anti-Angiotensin I Serum (Titer <1 µg/Röhrchen) beschichtet und in einem Plastikbeutel verpackt. Bei 2-27 °C aufbewahren.

4.3 Angiotensin-Testpuffer-Konzentrat (11X): konzentriertes Reagenz
Den gesamten Inhalt des Fläschchens mit konzentriertem Testpufferkonzentrat zu 100 ml destilliertem Wasser geben und gut mischen. Jedes Fläschchen enthält 10 ml Phosphatpuffer mit 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.

4.4 Angiotensin-Maleinat-Generationspuffer: gebrauchsfertiges Reagenz
Jedes Fläschchen enthält 5 ml Maleinatpuffer, Natrium EDTA, Neomycinsulfat und inerten blauen Farbstoff mit 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.

4.5 Angiotensin-Phenylmethylsulfonyl-Fluorid: gebrauchsfertiges Reagenz
Jedes Fläschchen enthält 1 ml Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) in Äthanol.

4.6 Renin-Aktivitätskontrolle: lyophilisiertes Reagenz
Vor dem Gebrauch mit 3,0 ml destilliertem Wasser durch Pipettieren bei 2-8 °C verdünnen. Das Fläschchen für 10 Minuten in ein Eisbad stellen und vorsichtig vortexen oder gründlich mischen. 1,0 ml Portionen in vorgekühlte Glas- oder Kunststoffröhrchen abfüllen. Fest verschließen und bei -20°C aufbewahren. Ein Aliquot kann in ein Eisbad gestellt oder bei 2-8 °C gekühlt werden, falls der Test sofort ausgeführt wird.
Die verdünnte Kontrolle muss für die Lagerung bei -20 °C eingefroren werden und bleibt für mindestens zwei Monate stabil. Die Kontrolle in einem Eisbad oder in einem Kühlschrank bei 2-8 °C auftauen; verdünnte Kontrollen dürfen nach dem Auftauen **nicht** wieder eingefroren werden.
Bei wiederholten Tests mit eingefrorenem Plasma mit unterschiedlichen Lagerzeiten konnten Variationen bei der PRA beobachtet werden.[19,20] Die Verwendung von eingefrorenem Plasma zur Kontrolle bei der PRA Bestimmung kann daher zu unzuverlässigen Ergebnissen führen. Die Renin-Aktivitätskontrolle wird routinemäßig bei der Angiotensin I **Generation** eingesetzt ebenso wie beim Radioimmunoassay und liefert einen zuverlässigen Index der Qualitätskontrolle für den gesamten Test. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt der Qualitätskontrolle.
Nach der Rekonstitution enthält jedes Fläschchen 3 ml behandeltes Humanplasma mit 0.1% Natriumazid.

4.7 Angiotensin I Kalibratoren (A-F): lyophilisiertes Reagenz
HINWEIS: Blindproben und Kalibratoren werden **nur** in dem Radioimmunoassay - Teil benutzt und **dürfen nicht** der Angiotensin I Generation unterzogen werden.
Jedes Fläschchen mit 2.0 ml destilliertem Wasser verdünnen und vor dem Gebrauch gut mischen. Blindproben und Kalibratoren müssen dann in einem Eisbad vor dem Test gekühlt werden. Sie können bei 2-8 °C bis zu zwei Wochen und bei -20 °C für längere Zeit aufbewahrt werden.

Nach der Rekonstitution enthält jedes Fläschchen 2 ml Angiotensin I, BSA in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung. Die Kalibratoren werden auf 0, 0,2, 0,8, 3,0, 10,0 und 50,0 ng/ml geeicht. Die Kalibratoren der DiaSorin Plasma-Reninaktivität werden mithilfe der Mastercharge der laufenden Produktion geeicht. Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische *In-vitro*-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR *ZUR IN-VITRO*-DIAGNOSTIK
Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.
Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer in den Vereinigten Staaten von der Bundesbehörde FDA genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatits-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des erworbenen Immundefekt-Syndroms (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, “Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren”, 4. Auflage, Mai 1999 oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

VORSICHT: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das gegebenenfalls mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlichst Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts” (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuches "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von Centers for Disease Control and Prevention (US-Krankheitsforschungszentren), Atlanta, Bundesstaat Georgia, 1976.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)
R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

REAGENZIEN MIT THIMEROSAL

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Thimerosal, das wiederum eine Quecksilberverbindung enthält. Quecksilberelemente, anorganisches Quecksilber, Quecksilberoxide und -verbindungen müssen in strikter Übereinstimmung mit allen lokalen, staatlichen und Bundesvorschriften entsorgt werden.
WARNHINWEIS: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien Fehlgeburten oder andere angeborene Defekte verursachen kann.

Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)

Ethanol enthaltende Reagenzien
R11 – Leicht entzündlich.
S16 - Von Zündquellen fernhalten — Nicht rauchen.
S43 - Zum Löschen Trockenlöschmittel oder Kohlendioxid verwenden.

PMSF enthaltende Reagenzien
R23/24/25 - Giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
S36 - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
S45 - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen.

Kaliumhydroxid enthaltende Reagenzien
R35 - Kann schwere Verätzungen verursachen.
S26 – bei Kontakt mit den Augen mit viel Wasser spülen und den Arzt aufsuchen.
S37/39 - Bei der Arbeit geeignete Handschuhe sowie einen geeigneten Augen- und Gesichtsschutz tragen.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Dieser Kit enthält radioaktives Material mit maximal 2 µCi (74 kBq – Kit CA-1533) oder 10 µCi (370 kBq – Kit CA-1553) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, welche im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:
Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WARNHINWEIS: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien

krebserregend ist.

ACHTUNG: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

6. PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG

Die Plasma-Renin-Aktivität ist aufgrund der Variation in der Reninausschüttung während des Tages am Morgen am höchsten und Proben sollten daher zu dieser Zeit genommen werden.[18,19] Venöses Blut unter aseptischen Bedingungen in ein luftleeres Röhrchen mit EDTA abnehmen. Die Proben können bei Zimmertemperatur abgenommen, transportiert und zentrifugiert werden. Blut kann vor dem Zentrifugieren bis zu sechs Stunden bei Zimmertemperatur abgestellt werden, ohne dass sich eine signifikante Akkumulation von Angiotensin I einstellt. Nach dem Zentrifugieren des Bluts kann das Plasma eingefroren bis zum Test gelagert werden. Proben können bei -20 °C bis zu einem Monat eingefroren

werden. Einfrieren und Auftauen in Tiefkühlschränken mit automatischer Abtauung sind zu vermeiden. Unterschiede konnten bei der PRA nach Aufbewahrung bei 2-8 °C und nach längerer Lagerung bei 2-8 °C beobachtet werden.[20, 21]
Gefrorene Proben vor dem Test bei Raumtemperatur auftauen.
Es sollten keine hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder Citrat-Proben verwendet werden. Heparin nicht als Antikoagulanz verwenden. Siehe Abschnitt "Grenzen des Verfahrens" für zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen und Informationen.

7. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN, DIE NICHT ZUM LIEFERUMFANG GEHÖREN

7.1 Destilliertes Wasser.

7.2 Wasserbad gleichmäßiger Temperatur, 37 ±2°C.

7.3 Eiswasserbad.

7.4 Messpipetten (1, 2, 3 und 5 ml).

7.5 Messzylinder (100 ml).

7.6 Präzisionspipetten (10, 100, 500 und 1000 µL).

7.7 Gammamesser.

7.8 Kunststoff- oder Glasröhrchen, 12 x 75 mm (für die Angiotensin I Generation).

7.9 Teströhrchenständer.

7.10 Vortex-Mixer (optional).

7.11 Wassersauger (optional).

7.12 Kunststoffbeschichtetes Saugpapier (optional).

8. ANGIOTENSIN I GENERATIONSVERFAHREN

8.1 1.0 ml Plasma in ein **unbeschichtetes** Glass- oder Kunststoffröhrchen geben, das mit der Kennnummer und dem Suffix 37 versehen ist.

8.2 10 µl PMSF Lösung und 100 µl Maleinat- Generationspuffer (pH 6,0) jedem 1,0 ml Aliquot ab Schritt 1 zugeben. Gut mischen und in ein Eisbad legen.

8.3 500 µL des Plasmas von Schritt zwei in das betreffende gekühlte und mit Suffix 4 markierte Röhrchen überführen.

8.4 Die 37 Reihen von Röhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad stellen. Die 4 Reihen von Röhrchen in einem Eisbad aufbewahren. Die Maleinat - Puffergeneration für 90 Minuten laufen lassen.

Es wird empfohlen, Patientenproben mit PRA-Werten unter 1,0 ng/ml/h in einer achtzehnstündigen Inkubation zu generieren und dann erneut zu testen.[4] Die Berechnungen müssen bei jeder Änderung der Generationszeit neu durchgeführt werden.

8.5 Nach der Beendigung der Generation die 37 Reihen Proben entweder in ein Eisbad stellen, falls der Assay sofort vorgenommen wird, oder zusammen mit den 4 Reihen Proben für zukünftige Tests in einem Tiefkühlschrank aufbewahren.

9. TESTVERFAHREN

Das Testverfahren umfasst die Vorbereitung einer Eichkurve, aus der der unbekannte Angiotensin I - Gehalt in den 37 und den 4 Reihen Proben interpoliert wird. Der Background (4 Reihen) wird dann von den entsprechenden 37 Generationsproben abgezogen.

9.1 Das Tracer-Pufferreagenz bei Raumtemperatur stehen lassen und vor dem Gebrauch gut mischen. Die Blindproben und Kalibratoren, die generierte Kontrolle und die generierten Patientenproben in einem Eisbad abstellen und vor dem Gebrauch gut mischen.

9.2 Einen Satz GammaCoat-Röhrchen in doppelter Ausführung nach dem folgenden Schema beschriften. Totalaktivität- [T_1,T_2] und B_0 Röhrchen [1, 2] sind möglicherweise für bestimmte Datenreduktionsprogramme erforderlich, können jedoch ausgelassen werden, wenn die Eichkurve auf halblogarithmischem Millimeterpapier aufgetragen wird.[23-25]

Röhrchen Nr.	Röhrcheninhalt		Code Buchst.	Angiotensin I (ng/0.1 ml)
T_1,T_2	Totalaktivität-Röhrchen (Tracer-Puffer)			
1, 2	Angiotensin I Blank	0 ng/ml	A	0
3, 4	Angiotensin I Kalibrator	0,2 ng/ml	B	0,02
5, 6	Angiotensin I Kalibrator	0,8 ng/ml	C	0,08
7, 8	Angiotensin I Kalibrator	3,0 ng/ml	D	0,30
9,10	Angiotensin I Kalibrator	10,0 ng/ml	E	1,0
11,12	Angiotensin I Kalibrator	50,0 ng/ml	F	5,0
13,14	Renin-Aktivitätskontrolle, 37 °C Generation			
15,16	Renin-Aktivitätskontrolle, 4 °C Generation			
17,18	Patient “X”, 37 °C Generation			
19, 20	Patient “X”, 4 °C Generation			

9.3 In die entsprechenden doppelten Röhrchen pipettieren:

a. 100 µl von jedem Angiotensin I Blank oder Kalibrator.

b. 100 µl von den “37” und “4” Generationsreihen der Renin-Aktivitätskontrolle in die entsprechende Gruppe von 4 Röhrchen.

c. 100 µl von den “37” und “4” Generationsreihen der Patientenproben in die entsprechende Gruppe von 4 Röhrchen.

9.4 Zu jedem Röhrchen sofort 1,0 ml Tracer-Puffer-Reagenz geben, einschließlich der Totalaktivität-Röhrchen. Reagenzien durch vorsichtiges Vortexen jedes Röhrchens mischen.

9.5 Alle Röhrchen bei Raumtemperatur (20-27 °C) drei Stunden lang inkubieren.

9.6 Mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen alle Röhrchen aspirieren oder dekantieren.

WENN DIE LÖSUNG NICHT VOLLSTÄNDIG ENTFERNT WIRD, KANN DIES ZU EINER SCHLECHTEN REPLIKATION UND FALSCHEN WERTEN FÜHREN.

Bei der Aspirationstechnik muss sichergestellt werden, dass die Kunststoffspitze des Saugers den Boden des beschichteten Röhrchens berührt und dass die gesamte Flüssigkeit entfernt wird.

Bei der Dekantationstechnik sollten die Röhrchen 3-5 Minuten lang umgedreht werden, damit die Flüssigkeit abfließen kann. Die Röhrchen auf Saugpapier ausschlagen, um die Flüssigkeit zu entfernen, bevor die Röhrchen aufrecht hingestellt werden.

9.7 Alle Röhrchen in einem Gammazähler 1 Minute messen. Dabei muss das Fenster für Jod-125 entsprechend angepasst werden.

9.8 Berechnen Sie die Ergebnisse. Siehe Abschnitte "Ergebnisse".

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Der Kit enthält eine Renin-Aktivitätskontrolle. Der Nennwert ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Die Kontrolle muss vor dem Test der Generation unterzogen werden.

Jedes Labor sollte Kontrollen bei mehreren Konzentrationen verwenden, um die Leistung des Assays zu überwachen. Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt werden. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten Qualitätskontrolltabellen geführt werden. Die Trends sollten mit Hilfe geeigneter statistischer Methoden ausgewertet werden. Jedes Labor sollte akzeptable Leistungsgrenzen festlegen.[22, 23]

11. ERGEBNISSE

11.1 Die gebundene Aktivität (Impulse pro Minute, I/M) für jedes Röhrchen notieren.

11.2 Auf halblogarithmischem Millimeterpapier die gebundene Aktivität (I/M) für Angiotensin I Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die pro Röhrchen zugesetzten Nanogramme (ng) Angiotensin I (horizontale Achse) auftragen.

11.3 Die bestpassende Kurve zeichnen. Für typische Daten siehe TABELLE I. ABBILDUNG 1 zeigt eine typische Eichkurve.

11.4 Für das einer Probe entsprechende Röhrchen die gebundene Aktivität (I/M) auf der vertikalen Achse ermitteln und einer die Eichkurveschneidenden horizontalen Linie folgen. Beim Schnittpunkt die Nanogramme (ng) Angiotensin I auf der horizontalen Achse ablesen. Für jede Probe und Kontrolle die durchschnittlichen ng "37" und die durchschnittlichen ng "4" bestimmen.

12. PLASMA-RENIN-AKTIVITÄT (PRA)

Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) wird in ng/ml/h des generierten Angiotensin I ausgedrückt. Die folgenden rechnerischen Korrekturen dienen dazu, den Wert ng/ml/h zu erhalten:

12.1 Den Durchschnittswert "4" (Background) von dem Mittelwert "37" (generiert) abziehen:

Netto ng = ng "37" – ng "4"

12.2 Größe der im beschichteten Röhrchen getesteten Probe (C): 0,1 ml_C

12.3 Verdünnung der Probe (S) mit Generationspuffer (B) und Inhibitor (I):

$$\frac{(1{,}0\ ml_S + 0{,}1 ml_B) + 0{,}01 ml_I}{1{,}0\ ml_S} = \frac{1{,}11 ml_{End}}{1{,}00\ ml_{Ausgang}}$$

12.4 Dauer der Angiotensin I Generation: 1,5 Stunden

HINWEIS: Bei Änderung der Dauer der Generationszeit muss diese Zahl entsprechend geändert werden.

12.5 Berechnung der Maleinat-Generation:

$$PRA = \frac{\left(\frac{ng\ "37" - ng\ "4"}{0{,}1 ml_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11 ml}{1{,}00\ ml}\right)}{1{,}5\ Stunden}$$

PRA = (7,40/ml/h) x (Netto ng)

Beispiel: Plasmaprobe des Patienten "X":

PRA = (0,41 - 0,08) ng x (7,40/ml/h)

PRA = 2,44 ng/ml/h

TABELLE I
Aufzeichnung der Daten
Nicht zur Berechnung unbekannter Proben verwenden.

Röhrchen Nr.	Inhalt Röhrchen	I/M Gebunden	Angiotensin I Stufe (ng/Röhrch.)	PRA Final (ng/ml/h)
T_1	Totalaktivität-Röhrchen (Tracer-Puffer)	29242	–	–
T_2	Totalaktivität-Röhrchen (Tracer-Puffer)	28992	–	–
1	Angiotensin I Blank 0 ng/Röhrchen	13617	–	–
2	Angiotensin I Blank 0 ng/Röhrchen	13048	–	–
3	Angiotensin I Kalibrator 0,02 ng/Röhrchen	13163	–	–
4	Angiotensin I Kalibrator 0,02 ng/Röhrchen	12625	–	–
5	Angiotensin I Kalibrator 0,08 ng/Röhrchen	11305	–	–
6	Angiotensin I Kalibrator 0,08 ng/Röhrchen	11291	–	–
7	Angiotensin I Kalibrator 0,3 ng/Röhrchen	6991	–	–
8	Angiotensin I Kalibrator 0,3 ng/Röhrchen	7110	–	–
9	Angiotensin I Kalibrator 1,0 ng/Röhrchen	3053	–	–
10	Angiotensin I Kalibrator 1,0 ng/Röhrchen	3056	–	–
11	Angiotensin I Kalibrator 5,0 ng/Röhrchen	1307	–	–
12	Angiotensin I Kalibrator 5,0 ng/Röhrchen	1232	–	–
13	Renin-Aktivitätskontrolle, 37 °C	3149	0,97	
14	Renin-Aktivitätskontrolle, 37 °C	3053	1,01	
			Mittel: 0,99	
15	Renin-Aktivitätskontrolle, 4 °C	8674	0,20	
16	Renin-Aktivitätskontrolle, 4 °C	8607	0,20	
			Mittel: 0,20	5,85
17	Plasmaprobe Patient “X”, 37 °C	4362	0,41	
18	Plasmaprobe Patient “X, 37 °C	4459	0,40	
			Mittel: 0,41	
19	Plasmaprobe Patient “X, 4 °C	8546	0,08	
20	Plasmaprobe Patient “X, 4 °C	8557	0,08	
			Mittel: 0,08	2,44

Typische Eichkurve
Nicht zur Berechnung unbekannter Proben verwenden.

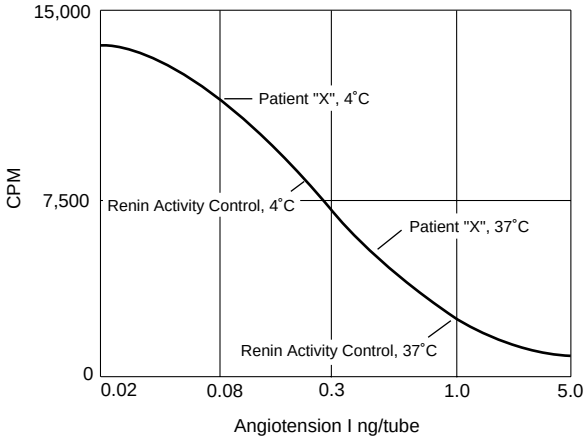


ABBILDUNG 1

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

Anmerkungen zum Verfahren

13.1 Der Kunststoffbeutel sollte für die Lagerung von ungebrauchten Röhrchen bei 2-27 °C fest verschlossen werden.

13.2 Der Wasserpegel muss über dem der Lösung in den Röhrchen gehalten werden. Die Röhrchen dürfen dabei nicht schwimmen.

13.3 Eine unsachgemäße Lagerung und Handhabung von Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.

13.4 Die Eiswassertemperatur muss während der Entnahme und der folgenden Handhabung der Proben streng überwacht werden.

13.5 Eingefrorene Proben müssen schnell auf Raumtemperatur aufgetaut und vor dem Pipettieren gründlich gemischt werden.

13.6 Es wurde beobachtet, dass Heparin die Reninreaktion bei Konzentrationen von 5 IE/ml hemmt; Heparin sollte daher nicht als Antikoagulanz bei Blutproben verwendet werden, die für den Test der Plasma-Renin-Aktivität bestimmt sind.[5]

13.7 Hämolysierte Proben enthalten Angiotensinasen und sollte daher nicht verwendet werden.

13.8 Veröffentlichte Daten zeigen deutlich, dass Linearität der Angiotensin I Generation während einer vorbestimmten Generationsdauer, selbst von dreißig Minuten bis zu einer Dauer von achtzehn Stunden, nicht vorausgesetzt werden kann.[3] Linearität als Ausgangspunkt mag eher die Regel als die Ausnahme selbst bei kontrolliertem Puffern mit jedem pH darstellen. Wahrscheinlich beeinflussen andere Faktoren als pH die Linearität bei der Angiotensin I Generation. Solange solche Variablen nicht eindeutig kontrollierbar sind, scheint es notwendig zu sein, nicht-lineare Merkmale vorauszusetzen.

13.9 Werden nicht die entsprechenden Kontroll-Werte erreicht, kann dies auf eine ungenaue Manipulation, eine falsche Handhabung oder den Verfall der Reagenzien hindeuten. Für jede Serie muss eine Eichkurve mit den entsprechenden Werten erstellt werden.

Erläuterungen

Es ist von entscheidender Bedeutung, dass physiologische Variablen wie die Haltung des Patienten, die Natriumaufnahme oder die Na-Ausscheidung über Harn während 24 Stunden, bei einer sorgfältigen Auswertung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Alter, Geschlecht und Rasse sind weitere wichtige Faktoren bei der Bewertung.

Änderungen der PRA können durch eine breites Spektrum von Arzneimitteln bedingt sein, einschließlich Diuretika, adrenergische Hemmstoffe, Vasodilatatoren, Antihypertensiva, hohe Dosen von Progestativa, Angiotensin II Antagonisten, Ovulationshemmern oder Östrogentherapien und Mineralocorticoid-Antagonisten. Die Verwendung von Kontraststoffen, wie sie in der Renographie benutzt werden, kann ebenfalls die PRA Werte verfälschen. Wird der pharmakologische Beitrag der Arzneimitteleinnahme des Patienten vernachlässigt, kann dies zu einer Fehlinterpretation der PRA - Werte führen.
Verschiedene klinische Bedingungen, einschließlich normaler Schwangerschaft, beeinflussen die PRA. Diese Faktoren sind eingehend in Artikeln, die von Forschern in Fachzeitschriften veröffentlicht wurden, behandelt worden.[27-30]

14. ERWARTETE WERTE

Die klinische Auswertung des PRA Kits wurde von einem unabhängigen Prüfer vorgenommen und die Ergebnisse werden in diesem Abschnitt zusammengefasst. Die vorgelegten Daten sind als Leitfaden für den Benutzer dieses Kits anzusehen. Aufgrund der Unterschiede in der Zusammensetzung der Patientenpopulation sind die Benutzer angehalten, ihre eigenen Daten zu erstellen (zum Beispiel PRA gegen Natriumexkretion - Nomogramm).

14.1 Auswirkung der Salzeinnahme

Plasmaproben und Urinproben über 24 Stunden wurden von normalen Erwachsenen ohne sichtbare kardiovaskuläre oder renale Störungen genommen. Jede Person erhielt eine Diät mit bekanntem Natrium- und Kaliumgehalt. Nach einer Zeit zur Herstellung des Gleichgewichts wurden Plasmaproben für PRA und Urinproben während 24 Stunden genommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in TABELLE II. Die Daten wurden in vier Untergruppen unterteilt, die auf dem Umfang der beobachteten Natriumexkretion basieren: *beliebiger* Salzkonsum (75-150 mEq/24 Stunden); Salzergänzende Diät (150 mEq/24 Stunden); und zwei salzlose Diäten. Es ist bei normalen klinischen Zuständen möglich, bescheidene Reduzierungen der Natriumexkretion zu erzielen, bis 30-75 mEq/in 24 Stunden. Der untere Bereich der Natriumexkretion von 0-30 mEq/24 Stunden ist ungewöhnlich und erfordert eine strenge Beschränkung der Natriumeinnahme. Das vorausgesagte umgekehrte Verhältnis zwischen PRA und Natriumexkretion wurde festgestellt. Da der Salzgehalt der Speisen regional unterschiedlich ist, ist es angebracht, wenn die Daten von PRA gegen Natriumexkretion von den betreffenden lokalen Labors ausgearbeitet werden.
Im Verlauf der klinischen Auswertung des Kits wurden Proben von ambulant behandelten und stationären Patienten des Krankenhauses ohne sichtbaren kardiovaskuläre oder renale Störungen genommen. Diese Personen unterlagen keinen Beschränkungen bei*der beliebigen* Salzeinnahme und es wurden keine Anstrengungen unternommen, ihre Tätigkeiten einzuschränken. Alle Proben wurden zwischen 8,00 und 10,00 morgens genommen. Die Daten dieser Untersuchungen finden sich in TABELLE III. Sie fallen unter den PRA Bereich, der für Personen mit normalem Salzkonsum für diese Population festgestellt wurde. Die höheren Werte der stationären Patienten können der Änderung des Salzgehalts durch die Krankenkost, dem Stress infolge der Krankenhausumgebung oder anderen unbestimmten Faktoren zugeschrieben werden.

TABELLE II
PRA mit eingeschränktem Salzkonsum

Na+ Exkretion mEq/24 h	Mittelwert ±1 SD (ng/ml/h)
0 - 30	16,34 ± 7,52
30 - 75	5,91 ± 1,82
75 -150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

TABELLE III
PRA mit uneingeschränktem Salzkonsum

	Mittelwert ±1 SD (ng/ml/h)
Zufällige ambulante Normalwerte	1,67 ± 0,83
Nicht ambulante Normalwerte	3,30 ± 1,85

14.2 Auswirkung der Haltung
Eine sorgfältige Beurteilung der PRA - Werte hängt von der klinischen Kenntnis der Haltung des Patienten ab, da diese die PRA - Werte beeinflusst. Die Auswirkung einer aufrechten Haltung nach einem nächtlichen Schlaf in Rückenlage wird in TABELLE IV gezeigt.

TABELLE IV
Auswirkung der Haltung

	Mittelwert ±1 SD (ng/m/h)
Rückenlage	1,24 ± 1,09
Aufrecht Haltung	2,63 ± 1,32

14.3 Furosemid Stimulation
Die klinische Einschätzung des Renin-Angiotensin-Systems kann die Bewertung der PRA-Änderung nach der Stimulation erfordern. Die Wirkung von Furosemid auf das Renin-Angiotensin-System, die durch die Änderung der PRA festgestellt wird, wurde entsprechend der in TABELLE V zusammengefassten Untersuchung bestimmt. Bei der Furosemid - Stimulation wurde ein beträchtlicher Anstieg der PRA - Werte nachgewiesen.

TABELLE V
Furosemid - Stimulation*

	Mittelwert ±1 SD (ng/ml/h)
Prä-Stimulation	2,36 ± 1,23
Post-Stimulation	6,92 ± 2,76

HINWEIS: Eine Monographie mit der vollständigen Bewertung ist auf Anfrage beim Kundendienst erhältlich. Die Monographie enthält die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen:

1. Harnaldosteron gegen PRA.
2. Nierenvenen-Reninstudien bei Patienten mit renovaskulärer Hypertonie.
3. PRA Bestimmung bei anephrischen Patienten.
4. PRA Ergebnisse bei Hämodialyse - Patienten.
5. Reninprofile von Patienten mit primärer Hypertonie.

* fünf Stunden nach Furosemid, 40 mg p.o.

15. TESTCHARAKTERISTIKA

15.1 Analytische Sensitivität

Die Sensitivität der Eichkurve wird als der kleinste erkennbare von Null verschiedene Wert festgelegt. Die statistische Schätzung der kleinsten nachweisbaren Konzentration (Sensitivität) wurde nach der Methode von D. Rodbard, (1978),[31] für dreißig Replikate am Nullpunkt der Eichkurve berechnet. Die berechnete Sensitivität beträgt 0,018 ng/ Röhrchen.

15.2 Wiederholgenauigkeit

Die Intra-Assay-Präzision wurde aus dem Mittelwert von 20 gleichzeitigen Assays pro Probe bestimmt. Die Inter-Assay-Präzision wurde aus dem Mittelwert der Duplikate für 20 getrennte Serien bestimmt.

Intra-Assay-Präzisions-Probe	Anzahl der Assays	Mittelwert (ng/ml/h)	Standard-abweichung (ng/ml/h)	Variations-koeffizient
Mischplasma A	20	1,6	0,16	10,0
Mischplasma B	20	6,2	0,28	4,6
Mischplasma C	20	17,9	1,68	9,4

Intra-Assay-Präzisions-Probe	Anzahl der Assays	Mittelwert (ng/ml/h)	Standard-abweichung (ng/ml/h)	Variations-koeffizient
Mischplasma A	20	1,6	0,09	5,6
Mischplasma B	20	10,7	0,82	7,6
Mischplasma C	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Avidität

Die berechnete Affinitätskonstante des Antiserumkits beträgt ca. 3 x 10^{10} Liter/Mol.

15.4 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des in diesem Kit verwendeten Antiserums wird ausgedrückt als das Verhältnis der Angiotensin I - Konzentration zur Konzentration der kreuzreaktiven Substanz bei 50 % Inhibierung der maximalen Bindung.

Verbindung	% Kreuzreaktivität
Angiotensin I	100
Tetradekapeptid*	0,02
Angiotensin II	<0,03
Angiotensin III	<0,03

* Synthetisches Reninsubstrat

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

EQUIPO GAMMACOAT® PARA RADIOINMUNOENSAYO DE ACTIVIDAD DE RENINA EN PLASMA

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*.

El equipo GammaCoat [^{125}I] tiene como finalidad la determinación cuantitativa de la actividad de renina en plasma (PRA) mediante radioinmunoensayo de angiotensina I generada.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La renina es una enzima proteolítica, con peso molecular aproximado de 40.000, liberada por la células yuxtaglomerulares del riñón. La enzima actúa en la circulación general para separar su sustrato, una globulina alfa 2 sintetizada por el hígado, para producir angiotensina I decapeptídica.

La angiotensina I se separa rápidamente por la actividad de la enzima conversora, principalmente en los pulmones, en angiotensina II octapeptídica biológicamente activa. A su vez, la angiotensina II se degrada rápidamente en fragmentos peptídicos inactivos debido a la acción de las enzimas presentes en el plasma y los tejidos, conocidas como angiotensinasas. La vía metabólica del sistema de renina-angiotensina se describe más adelante:

sustrato de renina
↓ renina

angiotensina I
↓ enzima conversora

angiotensina II
↓ angiotensinasas

fragmentos peptídicos inactivos

La angiotensina II tiene una vida media *in vivo* extremadamente corta, pero es el más potente de los vasopresores conocidos. El papel de la angiotensina II es fundamental en diversas formas de hipertensión y para la regulación de la presión sanguínea. Además, se ha establecido la angiotensina II como la influencia principal para la secreción de aldosterona por la glándula suprarrenal.

Diversas dificultades técnicas asociadas a las mediciones de los niveles de angiotensina II en sangre han retrasado la aceptación general de este ensayo en los laboratorios clínicos. Dado que los niveles de angiontensina I son una representación directa de la actividad de renina en plasma, su determinación es una práctica adoptada ampliamente para evaluar el sistema de renina-angiotensina en los estados de enfermedad. La medición de la actividad de renina en plasma en pacientes hipertensos constituye una ayuda importante para el diagnóstico diferencial de aldosteronismo primario y secundario. La estimación de la actividad de renina es igualmente valiosa para determinar el pronóstico y la terapia más apropiada para las personas con hipertensión esencial.

Se ha descrito el radioinmunoensayo para angiotensina I y su aplicación como un índice de la actividad de renina en plasma.[1] El procedimiento del equipo GammaCoat para determinar la actividad de renina en plasma se ha adaptado a partir de este método.

3. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El procedimiento se basa en los principios de unión competitivos del radioinmunoensayo.[2] En el equipo GammaCoat para RIA de actividad de renina en plasma [^{125}I], se ha inmovilizado el anticuerpo en la pared inferior interna del tubo de GammaCoat. La determinación de PRA comprende la incubación inicial de plasma para generar angiotensina I, seguida de la cuantificación de angiotensina I mediante radioinmunoensayo. La generación de angiotensina I en el sistema de sustrato humano está regida por:

3.1 pH de la incubación.
3.2 grado de dilución del plasma.
3.3 elección de los inhibidores de enzimas.

3.4 factores desconocidos de cada muestra de plasma, como la concentración del nivel de sustrato de renina.
3.5 duración de la incubación.
3.6 temperatura de incubación.

pH de generación
El índice de generación de angiotensina I *in vitro* es dependiente del pH. Este equipo de procedimiento utiliza un pH de generación de 6.0, el pH habitual de las muestras tras la adición de un tampón de pH 5.7. La ventaja de la incubación a pH 6.0, en lugar del pH 7 fisiológico, se basa en que produce un índice de generación de angiotensina I dos veces mayor y con una sensibilidad equivalente más apropiada para las muestras de renina baja.[3-14] Como resultado de esta optimización pueden utilizarse tiempos de generación más cortos.

Elección del inhibidor de la enzima
Se puede utilizar una variedad de agentes para bloquear la conversión de angiotensina en angiotensina II y para evitar la degradación proteolítica durante la generación de angiotensina I.[15-17] En este procedimiento se ha utilizado fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor.

Efectos de la dilución del plasma
Debe evitarse la dilución del plasma, ya que la reacción de la renina es sustratodependiente de la concentración del sustrato de renina que existe normalmente en el plasma. Los efectos de la dilución del sustrato se pueden observar en todos los intervalos durante la generación; a una dilución mayor se han observado efectos más marcados.[4]

Duración de la generación
Se debe emplear el tiempo de práctica más corto posible para determinar la actividad de la enzima a fin de proporcionar la mejor estimación de la velocidad inicial de la reacción y minimizar el consumo del sustrato. El radioinmunoensayo de angiotensina I es lo bastante sensible como para permitir la determinación de PRA con condiciones optimizadas de generación de angiotensina I a pH 6.0.
El método GammaCoat del equipo de actividad de renina en plasma ofrece un tiempo de generación reducido al estar la muestra de plasma mínimamente diluida, tamponada a un pH optimizado y procesada con un inhibidor que es eficaz al pH seleccionado. Se ha sugerido que las muestras de bajo nivel se pueden cuantificar generando las muestras durante 18 horas y procediendo después a su ensayo.[4]

Duración del radioinmunoensayo
El equipo GammaCoat de actividad de renina en plasma utiliza una incubación de radioinmunoensayo de tres horas. Los resultados están disponibles en el mismo día de trabajo.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Tubos recubiertos de suero de conejo antiangiotensina I	1 bolsa/100 tubos	5 bolsas/100 tubos
Tampón de ensayo angiotensina (11x)	1 vial/10 mL	5 viales/10 mL
Tampón de generación de maleato de angiotensina	1 vial/5 mL	3 viales/5 mL
PMSF angiotensina	1 vial/1 mL	2 viales/1 mL
Control de actividad de renina	1 vial/3 mL	2 viales/3 mL
Calibradores de angiotensina (A-F)	6 viales/2 mL	12 viales/2 mL
Trazador de angiotensina	2 viales/5 mL	10 viales/5 mL
Número de pruebas	100	500

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8 °C. Una vez abiertos, almacene los reactivos como se recomienda a continuación. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La fecha de caducidad del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de caducidad del trazador.

No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Trazador de angiotensina I [^{125}I]: reactivo liofilizado
Reconstituya el vial del trazador de angiotensina I [^{125}I] con 5 mL de agua purificada. Mezcle bien el vial invirtiéndolo o mezclando suavemente en vórtex. Agregue el contenido de **dos** viales de trazador a 100 mL de tampón de ensayo. El reactivo del tampón del trazador es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.
Tras la reconstitución, cada vial contiene aproximadamente 1 µCi de trazador (angiotensina I <1 µg/mL) en 5 mL de solución salina tamponada de fosfato con albúmina de suero bovino con thimerosal añadido como conservante.

4.2 Tubos recubiertos de suero de conejo antiangiotensina I: reactivo listo para su uso Tubos de 12 x 75 mm recubiertos con suero de conejo antiangiotensina I (titular <1 µg/tubo) y empaquetados en una bolsa de plástico. Almacene a 2-27 °C.

4.3 Concentrado de tampón de ensayo angiotensina (11X): reactivo concentrado
Agregue todo el contenido del vial de concentrado de tampón de ensayo a 100 mL de agua purificada y mezcle bien. Cada vial contiene 10 mL de tampón fosfato con azida sódica al 0,1% como conservante.

4.4 Tampón de generación de maleato de angiotensina: reactivo listo para su uso
Cada vial contiene 5 mL de tampón maleato, EDTA sodio, sulfato de neomicina y colorante azul inerte con azida sódica al 0,1% como conservante.

4.5 Fluoruro de fenilmetilsulfonilo: reactivo listo para su uso
Cada vial contiene 1 mL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en etanol.

4.6 Control de actividad de renina: reactivo liofilizado
Reconstituya antes de utilizar dosificando con pipeta 3,0 mL de agua purificada a 2-8 °C. Mantenga el vial en un baño de hielo durante 10 minutos, y mezcle suavemente en vórtex o agitador para mezclarlo a fondo. Distribuya partes alícuotas de 1,0 mL en tubos de plástico o vidrio enfriados previamente. Selle firmemente y almacene a -20 °C. Si el ensayo se va a realizar en este momento, puede mantener una parte alícuota en baño de hielo o refrigerada a 2-8 °C.
El control reconstituido debe almacenarse congelado a -20 °C y es estable durante dos meses como mínimo. Los ciclos de congelación-descongelación se deben realizar en un baño de hielo o en refrigerador a 2-8 °C; el control reconstituido **no** debe ser recongelado de nuevo tras el ciclo de congelación-descongelación.
Se han observado variaciones de PRA tras el ensayo repetido de plasma congelado después de varios períodos de almacenamiento.[19,20] Por lo tanto, el uso de plasma congelado como control en las determinaciones de PRA puede producir resultados no fiables. El control de actividad de renina se utiliza durante la generación de **angiotensina I**, así como en radioinmunoensayo, siempre que se proporcione un índice de control de calidad fiable durante todo el proceso. Para obtener más información, consulte la sección Control de calidad.
Tras la reconstitución, cada vial contiene 3 mL de plasma humano procesado con azida sódica al 0,1%.

4.7 Calibradores de angiotensina I (A-F): reactivo liofilizado
NOTA: Los blancos y calibradores se utilizan **sólo** en la parte de radioinmunoensayo y **no** deben utilizarse durante la generación de angiotensina I.
Reconstituya cada vial con 2,0 mL de agua purificada y mezcle bien antes de utilizarlo. Los blancos y calibradores deben enfriarse en un baño de hielo antes del ensayo. Pueden almacenarse a 2-8 °C un máximo de dos semanas, y a -20 °C para almacenamientos más prolongados.

Tras la reconstitución, cada vial contiene 2 mL de angiotensina I, BSA en solución salida tamponada con fosfato. Los calibradores están calibrados a 0, 0,2, 0,8, 3,0, 10,0 y 50,0 ng/mL, respectivamente. Para la calibración de los calibradores de actividad de renina en plasma de DiaSorin se ha utilizado el lote maestro de producción actual. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico *in vitro*.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS CON MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátense como potencialmente infecciosos.

Todas las unidades de suero/plasma de donante usados en la preparación de este producto se han comprobado mediante un método aprobado por la FDA estadounidense y han dado resultados negativos para la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no puede garantizarse que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª ed., mayo 1999 o actual.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte “Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts,” en el manual Guide-Safety Management Nº CDC-22, publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE THIMEROSAL

Algunos reactivos de este equipo contienen thimerosal, el cual contiene un componente de mercurio. La eliminación de mercurio elemental, inorgánico, óxidos de mercurio o compuestos de mercurio deberá seguir rigurosamente toda la normativa local, estatal y federal al respecto.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida en el estado de California como causante de malformaciones congénitas o de daños a los órganos reproductores.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/CE)

Reactivos con contenido de etanol

R11 - Altamente inflamable.

S16 - Manténgase alejado de fuentes de ignición. No fumar.

S43 - En caso de incendio, utilícense productos químicos secos o dióxido de carbono.

Reactivos con contenido de PMSF
R23/24/25 - Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.
S36 - Utilícese ropa de protección adecuada.
S45 - En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

Reactivos con contenido de hidróxido de potasio
R35 - Causa quemaduras graves.
S26 - En caso de contacto con los ojos, lávense inmediatamente con abundante agua y solicítese asistencia médica inmediata.
S37/39 - Utilice guantes y protección facial/ocular adecuada.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO 125

Este equipo contiene material radiactivo que no excede de 2 µCi (74 kBq) (CA-1533) o de 10 µCi (370 kBq – equipo CA-1553) de yodo 125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La actividad de renina en plasma es más alta por la mañana debido a la variación en la liberación de renina que se produce durante el día y, por tanto, las muestras deben tomarse regularmente a la misma hora.[18,19] Recoja una muestra de sangre venosa de forma aséptica en un tubo de vidrio vacío que contenga EDTA. Las muestras deberán ser recogidas, transportadas y centrifugadas a temperatura ambiente. La sangre puede mantenerse a temperatura ambiente durante seis horas antes de la centrifugación sin que se produzca un aumento significante de angiotensina I. Una vez centrifugada la sangre, puede congelar y almacenar el plasma hasta el momento del ensayo. Las muestras pueden mantenerse congeladas a -20 °C durante un mes. Deben evitarse los ciclos de congelación-descongelación que pueden producirse en congeladores con desescarchado automático. Se han observado variaciones de PRA tanto en el almacenamiento a 2-8 °C como en el almacenamiento prolongado a -20 °C.[20, 21]

Antes del ensayo, descongele rápidamente las muestras congeladas a temperatura ambiente.
Debe evitarse el uso de muestras hemolizadas, lipémicas, ictéricas o citradas. No utilice heparina como anticoagulante. Consulte la sección Limitaciones al procedimiento para obtener más información o instrucciones.

7. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

7.1 Agua purificada.
7.2 Baño de agua a temperatura constante de 37 ± 2 °C.
7.3 Baño de agua con hielo.
7.4 Pipetas volumétricas (1, 2, 3 y 5 mL).
7.5 Cilindro graduado (100 mL).
7.6 Pipetas de precisión (10, 100, 500 y 1.000 µL).
7.7 Contador gamma.
7.8 Tubos de plástico o vidrio, 12 x 75 mm (para generación de angiotensina I).
7.9 Gradilla de tubos de prueba.
7.10 Mezclador vórtex (opcional).
7.11 Aspirador de agua (opcional).
7.12 Papel absorbente con reverso de plástico (opcional).

8. PROCEDIMIENTO DE GENERACIÓN DE ANGIOTENSINA I

8.1 Transfiera 1,0 mL de plasma a un tubo de plástico o vidrio **no recubierto** marcado con el número de identificación y el sufijo 37.

8.2 Agregue 10 µL de la solución PMSF y 100 µL del tampón de generación de maleato pH 6.0) a cada alícuota de 1,0 mL del paso 1. Mezcle bien y colóquelos en un baño de hielo.

8.3 Transfiera 500 µL del plasma del paso 2 al tubo enfriado correspondiente marcado con el sufijo 4.

8.4 Coloque los tubos de la serie 37 en un baño de agua a 37 °C. Mantenga los tubos de la serie 4 en un baño de hielo. Lleve a cabo la generación del tampón de maleato durante 90 minutos.

Se ha sugerido que las muestras de pacientes con valores de PRA inferiores a 1,0 ng/mL/hr se deben generar en una incubación de 18 horas y ser sometidas a ensayo de nuevo.[4] Los cálculos deberán ajustarse para reflejar cualquier cambio en el tiempo de generación.

8.5 Al final del período de generación, transfiera la serie de muestras 37 a un baño de hielo, si el ensayo se va a realizar inmediatamente, o al congelador que contiene la serie 4 si el ensayo se va a efectuar en el futuro.

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El procedimiento de ensayo incluye la preparación de una curva de calibración a partir de la cual se interpola el contenido de angiotensina I desconocido de las muestras de las series 37 y 4. A continuación, se sustrae el fondo (serie 4) de las muestras de generación 37 correspondientes.

9.1 Deje que el reactivo tampón-trazador alcance la temperatura ambiente y mezcle bien antes de utilizarlo. Mantenga los blancos, calibradores, control generado y muestras del paciente generadas en un baño de hielo y mezcle bien antes de utilizarlos.

9.2 Etiquete por duplicado un juego de tubos GammaCoat de acuerdo con el programa siguiente. Los tubos de cuentas totales [T_1,T_2] y B_0 [1, 2] pueden ser necesarios para ciertos programas de reducción de datos, pero se pueden omitir si la curva de calibración se va a trazar en un papel milimetrado semilogarítmico.[23-25]

Tubo nº	Contenido de los tubos		Código letra	Angiotensina I (ng/0,1 mL)
T_1,T_2	Cuentas totales (Trazador-Tampón)			
1,2	Blanco de angiotensina I	0 ng/mL	A	0
3,4	Calibrador de angiotensina I	0,2 ng/mL	B	0,02
5,6	Calibrador de angiotensina I	0,8 ng/mL	C	0,08
7,8	Calibrador de angiotensina I	3,0 ng/mL	D	0,30
9,10	Calibrador de angiotensina I	10,0 ng/mL	E	1,0
11,12	Calibrador de angiotensina I	50,0 ng/mL	F	5,0
13,14	Control de actividad de renina, generación 37 °C			
15,16	Control de actividad de renina, generación 4 °C			
17,18	Paciente “X”, generación 37 °C			
19,20	Paciente “X”, generación 4 °C			

9.3 Con una pipeta, suministre en los tubos duplicados correspondientes:

- **a.** 100 µL de cada calibrador o blanco de angiotensina I.
- **b.** 100 µL de control de actividad de renina del conjunto de generación “37” y “4” en el grupo de 4 tubos apropiado.
- **c.** 100 µL de cada muestra de pacientes del conjunto de generación “37” y “4” en el grupo de 4 tubos apropiado.

9.4 Agregue inmediatamente 1,0 mL de reactivo trazador-tampón a cada tubo, incluidos los de cuentas totales. Mezcle los reactivos mezclando suavemente en vórtex cada tubo por separado.

9.5 Incube todos los tubos a temperatura ambiente (20 -27 °C) durante 3 horas.

9.6 Aspire o decante todos los tubos excepto los de cuentas totales.

EN EL CASO DE QUE NO SE ELIMINE DE FORMA CORRECTA LA DISOLUCIÓN ADHERIDA, LA DUPLICACIÓN PUEDE RESULTAR INSUFICIENTE Y LOS VALORES INCORRECTOS.

Si se utiliza la técnica de aspiración, compruebe que la punta de plástico del tubo de aspiración toca la parte inferior del tubo recubierto y que se extrae todo el líquido.

Si se utiliza la técnica de decantación, permita que los tubos drenen en posición invertida durante 3 a 5 minutos. Golpee suavemente los tubos sobre un papel absorbente para eliminar todo el líquido adherido antes de colocar los tubos hacia arriba.

9.7 Determine el número de cuentas de todos los tubos en un contador gamma durante 1 minuto con la ventana ajustada de forma apropiada para yodo 125.

9.8 Calcule los resultados. Consulte la sección Resultados.

10. CONTROL DE CALIDAD

El equipo contiene un control de actividad de renina. Consulte el valor nominal en la etiqueta del vial. Someta el control a generación antes del ensayo.

Cada laboratorio debe utilizar controles a diferentes niveles para supervisar el resultado del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos. Deben realizarse gráficos de control de calidad para seguir el resultado de los controles, así como utilizarse métodos estadísticos apropiados para evaluar las tendencias. Cada laboratorio debe determinar los límites de resultados aceptables.[22, 23]

11. RESULTADOS

11.1 Registre las cuentas por minuto (CPM) unidas para cada tubo.

11.2 Trace la unión de CPM para calibradores de angiotensina I (eje vertical) frente a los nanogramos (ng) de angiotensina I añadidos a cada tubo (eje horizontal) en un papel milimetrado semilogarítmico.

11.3 Dibuje la curva que mejor se ajuste. Para ver los datos típicos, consulte la TABLA I. La FIGURA 1 muestra una curva de calibración típica.

11.4 Localice la unión de CPM de cada tubo correspondiente a cada muestra en el eje vertical y siga una línea horizontal que interseccione con la curva de calibración. En el punto de intersección, lea la angiotensina I (ng) del eje horizontal. Por cada muestra y control, determine el ng promedio de "37" y el ng promedio de "4".

12. ACTIVIDAD DE RENINA EN PLASMA (PRA)

La actividad de renina en plasma (PRA) se expresa como ng/mL/hr de angiotensina I generada. Para obtener ng/mL/hr se han aplicado las correcciones matemáticas siguientes:

12.1 Reste el valor promedio de "4" (Fondo) del promedio de "37" (Generado):

ng neto = ng "37" – ng "4"

12.2 Tamaño de la muestra ensayada en tubo recubierto (C): 0,1 mL_C

12.3 Dilución de la muestra (S) por tampón de generación (B) e inhibidor (I):

$$\frac{(1{,}0\ mL_S + 0{,}1\ mL_B) + 0{,}01\ mL_I}{1{,}0\ mL_S} = \frac{1{,}11\ mL_{Final}}{1{,}00\ mL_{Inicial}}$$

12.4 Tiempo de generación de angiotensina I: 1,5 horas

NOTA: Si se ha alterado el tiempo de generación, deberán hacerse los cambios adecuados en este número.

12.5 Cálculo de generación de maleato:

$$PRA = \frac{\left(\frac{ng\ "37" - ng\ "4"}{0{,}1\ mL_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11\ mL}{1{,}00\ mL}\right)}{1{,}5\ horas}$$

PRA = (7,40/mL/hora) x (ng neto)

Ejemplo: Muestra de plasma de paciente "X":

PRA = (7,40/mL/hora) x (ng neto)

PRA = 2,44 ng/mL/hora

TABLA I
Registro de los datos
No utilizar para calcular desconocidos

Tubo Nº	Contenido de los tubos	CPM unida	Angiotensina I Nivel (ng/tubo)	PRA Final (ng/mL/hr)
T_1	Cuentas totales (Trazador-Tampón)	29242	–	–
T_2	Cuentas totales (Trazador-Tampón)	28992	–	–
1	Blanco de angiotensina I 0 ng/tubo	13617	–	–
2	Blanco de angiotensina I 0 ng/tubo	13048	–	–
3	Calibrador de angiotensina I 0,02 ng/tubo	13163	–	–
4	Calibrador de angiotensina I 0,02 ng/tubo	12625	–	–
5	Calibrador de angiotensina I 0,08 ng/tubo	11305	–	–
6	Calibrador de angiotensina I 0,08 ng/tubo	11291	–	–
7	Calibrador de angiotensina I 0,3 ng/tubo	6991	–	–
8	Calibrador de angiotensina I 0,3 ng/tubo	7110	–	–
9	Calibrador de angiotensina I 1,0 ng/tubo	3053	–	–
10	Calibrador de angiotensina I 1,0 ng/tubo	3056	–	–
11	Calibrador de angiotensina I 5,0 ng/tubo	1307	–	–
12	Calibrador de angiotensina I 5,0 ng/tubo	1232	–	–
13	Control de actividad de renina, 37 °C	3149	0,97	
14	Control de actividad de renina, 37 °C	3053	1,01	
			Prom: 0,99	
15	Control de actividad de renina, 4 °C	8674	0,20	
16	Control de actividad de renina, 4 °C	8607	0,20	
			Prom: 0,20	5,85
17	Muestra de plasma de paciente, 37 °C	4362	0,41	
18	Muestra de plasma de paciente, 37 °C	4459	0,40	
			Prom: 0,41	
19	Muestra de plasma de paciente, 4 °C	8546	0,08	
20	Muestra de plasma de paciente, 4 °C	8557	0,08	
			Prom: 0,08	2,44

Curva de calibración típica
No utilizar para calcular desconocidos

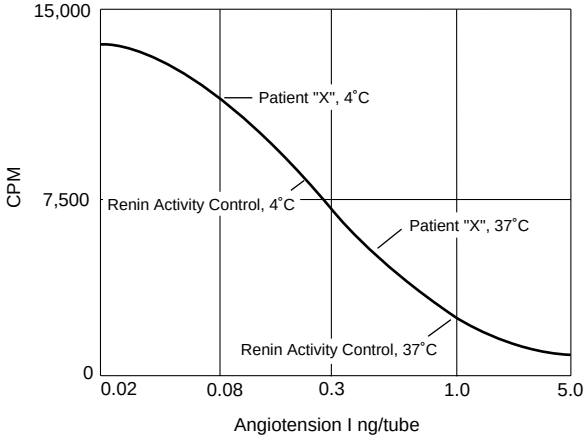


FIGURA 1

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Procedimiento

13.1 Las bolsas de plástico de los tubos recubiertos deben cerrarse bien si se guardan tubos no utilizados y almacenarse a 2-27 °C.

13.2 El nivel del agua debe mantenerse por encima de la solución de los tubos sin permitir que éstos floten.

13.3 El usuario debe saber que los resultados pueden ser erróneos si las muestras de los pacientes se almacenan o manejan de modo incorrecto.

13.4 Debe prestarse una atención estricta al mantenimiento de la temperatura del agua helada durante la recogida y el manejo posterior de las muestras.

13.5 Antes de la dosificación con pipeta, descongele rápidamente las muestras congeladas a temperatura ambiente y mézclelas bien.

13.6 Se ha observado que la herapina inhibe la reacción de renina en concentraciones de 5 IU/mL; por lo tanto, no se debe utilizar heparina como anticoagulante en muestras de sangre destinadas a ensayo para determinar la actividad de renina en plasma.[5]

13.7 Los especímenes hemolizados contienen angiotensinasas y no deben ser utilizados.

13.8 Los datos publicados muestran evidencia de que no es posible asumir la linealidad de la generación de angiotensina I durante un período de generación determinado, incluso en un espacio tan breve como 30 minutos o tan largo como 18 horas.[3] El punto de partida de la linealidad debe ser la regla antes que la excepción, incluso con el empleo de tampones controlados con cualquier pH. Es posible que otros factores distintos del pH puedan influenciar la linealidad de la generación de angiotensina I. Hasta que tales variables sean totalmente controlables, no parece necesario anticipar características de no linealidad.

13.9 Si no se obtienen los valores de control adecuados puede ser debido a manipulaciones imprecisas, tratamiento inadecuado o deterioro de los reactivos. Para cada serie de ensayos debe establecerse una curva de calibración basada en los valores adecuados para los calibradores.

Interpretación

Para una interpretación precisa de los resultados del ensayo, es crítico considerar ciertas variables fisiológicas, como la postura del paciente, la ingesta de sodio o la excreción de sodio en orina durante 24 horas. Otros factores importantes que deben tenerse en cuenta son la edad, sexo y raza del paciente.

Los cambios de PRA pueden verse afectados por un espectro de fármacos, incluidos diuréticos, agentes bloqueadores de adrenérgicos, vasodilatadores, anti hipertensores, grandes dosis de progesterona, antagonistas de angiotensina II, anticonceptivos orales o terapia con estrógenos y antagonistas de mineralocorticoides. El uso de diatrizoato, como en la renografía, puede afectar también los valores de PRA. Si no se tiene en cuenta la contribución farmacológica derivada de la ingesta de fármacos del paciente, se puede producir una interpretación errónea de los valores de PRA.
El valor de PRA puede verse afectado por otras condiciones clínicas, incluido el embarazo normal. Estos factores se han manifestado de forma concisa en la revisión de artículos publicados por varios investigadores.[27-30]

14. VALORES PREVISTOS

La evaluación clínica de este equipo PRA ha sido llevada a cabo por investigadores independientes; los resultados obtenidos se resumen brevemente en esta sección. Los datos presentados tienen como finalidad servir de guía para el usuario de este equipo. Debido a las varianzas en la población de pacientes, es conveniente que los usuarios establezcan datos propios (por ejemplo, PRA frente a Nomograma de excreción de sodio).

14.1 Efecto de la ingesta de sal

Las muestras de plasma y las recogidas de orina durante 24 horas proceden de sujetos adultos normales sin trastornos cardiovasculares ni renales aparentes. Cada sujeto estuvo sometido a una dieta con niveles conocidos de potasio y sodio. Tras un período de equilibrio, se tomaron las muestras de plasma y orina de 24 horas para la determinación de PRA. Los resultados de estos estudios se reflejan en la TABLA II. Los datos se dividieron en cuatro subgrupos basados en el rango de excreción de sodio observado: ingesta de sal *ad libitum* (75-150 mEq/24 horas); dieta con suplemento de sal (150 mEq/24 horas); y dos dietas con sal restringida. En circunstancias de rutina clínica es factible obtener reducciones modestas de sal en la excreción de sodio, hasta 30-75mEq/24 horas. El rango más bajo de excreción de sodio, 0-30 mEq/24 horas, es inusual y requiere la restricción severa de la ingesta de sodio. Se ha observado la relación inversa prevista entre PRA y la excreción de sodio en orina. Dado que el contenido en sal de la dieta varía según las regiones, se sugiere que cada laboratorio desarrolle sus propios datos sobre PRA frente a excreción de sodio.
En el transcurso de la evaluación clínica de este equipo se obtuvieron muestras procedentes de adultos ambulatorios u hospitalizados sin trastornos cardiovasculares ni renales aparentes. Tales sujetos tuvieron ingestas de sodio *ad libitum* y no se realizó ningún esfuerzo para controlar sus actividades. Todas las muestras se obtuvieron entre las 8 AM y las 10 AM. Los datos de estas observaciones se reflejan en la TABLA III. Se encuentran dentro del rango de PRA observado para sujetos con ingesta de sal normal para esta población. Los valores más altos en sujetos hospitalizados pueden deberse a las alteraciones en sal de la dieta impuestas por la alimentación del centro hospitalario o a otros factores no determinados.

TABLA II
PRA con ingesta de sal restringida

Na+ Excreción mEq/24 horas	Media ±1 D.E. (ng/mL/horas)
0 - 30	16,34 ± 7,52
30 - 75	5,91 ± 1,82
75 -150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

TABLA III
PRA con ingesta de sodio ad libitum

	Media ±1 D.E. (ng/mL/horas)
Sujetos ambulatorios normales aleatorios	1,67 ± 0,83
Suejos normales no ambulatorios	3,30 ± 1,85

14.2 Efecto de la posición
La determinación precisa de los valores de PRA depende del conocimiento clínico sobre la postura del paciente, ya que la posición de éste influye sobre los valores de PRA. El efecto de asumir una posición erecta tras una noche de sueño en posición supina se refleja en la TABLA IV.

TABLA IV
Efecto de la posición

	Media ±1 D.E. (ng/mL/horas)
Supina	1,24 ± 1,09
Erecta	2,63 ± 1,32

14.3 Estimulación de furosemida
La valoración clínica del sistema de renina-angiotensina puede precisar la evaluación del cambio de PRA posterior a la simulación. El efecto de la furosemida en el sistema de renina-angiotensina, como se ha detectado por los cambios de PRA, se ha determinado mediante un estudio cuyo resumen se refleja en la TABLA V. Se produjo un incremento significante en los valores de PRA con la estimulación de furosemida.

TABLA V
Estimulación de furosemida*

	Media ±1 D.E. (ng/mL/horas)
Pre-estimulación	2,36 ± 1,23
Post-estimulación	6,92 ± 2,76

NOTA: Si desea obtener el documento monográfico en el que se detalla todo el proceso de evaluación, solicítelo al servicio al cliente. El monográfico contiene los resultados de los estudios siguientes:

1. aldosterina en orina frente a PRA.
2. estudios de renina venosa renal en pacientes con hipertensión renovascular.
3. determinación de PRA en pacientes anéfricos.
4. resultados de PRA en pacientes sometidos a hemodiálisis.
5. perfil de renina en pacientes con hipertensión esencial.

* cinco horas tras furosemida, 40 mg p.o.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RESULTADO

15.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad de la curva de calibración se define como el valor independiente más pequeño distinto de cero. Se calculó una estimación estadística de la concentración mínima que puede detectarse (sensibilidad) de acuerdo con el método de D. Rodbard, (1978),[31] para treinta réplicas en el punto cero de la curva de calibración. La sensibilidad calculada es de 0,018 ng/tubo.

15.2 Precisión

La precisión intraserie se determinó a partir del promedio de 20 ensayos simultáneos por muestra. La precisión interserie se determinó a partir del promedio de los duplicados para 20 series independientes.

Muestra para precisión intraserie	Número de pruebas	Media (ng/mL/hora)	Desviación estándar (ng/mL/hora)	Coeficiente de variación
Pool de plasma A	20	1,6	0,16	10,0
Pool de plasma B	20	6,2	0,28	4,6
Pool de plasma C	20	17,9	1,68	9,4

Muestra para precisión interserie	Número de pruebas	Media (ng/mL/hora)	Desviación estándar (ng/mL/hora)	Coeficiente de variación
Pool de plasma A	20	1,6	0,09	5,6
Pool de plasma B	20	10,7	0,82	7,6
Pool de plasma C	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Avidez

La afinidad constante calculada del antisuero del equipo es aproximadamente de 3 x 10^{10} litros/mol.

15.4 Especificidad analítica

Los datos de la reactividad cruzada del antisuero utilizado en este equipo se expresan como la proporción de concentración de angiotensina I por la concentración de la sustancia de reacción cruzada con un 50% de inhibición de unión máxima.

Compuesto	% reactividad cruzada
Angiotensina I	100
Tetradecapéptido*	0,02
Angiotensina II	<0,03
Angiotensina III	<0,03

* Sustrato de renina sintética.

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA

KIT PER L'ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA DELL'ATTIVITÀ DELLA RENINA PLASMATICA GAMMACOAT®

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Il Kit per l'analisi radioimmunologica dell'attività della renina plasmatica GammaCoat [^{125}I] serve per la determinazione quantitativa dell'attività della renina plasmatica (ARP) mediante l'analisi radioimmunologica dell'angiotensina I generata.

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

La renina, un enzima proteolitico del peso molecolare approssimativo di 40.000, viene rilasciata dalle cellule iuxtaglomerulari del rene. L'enzima agisce nella circolazione generale allo scopo di scindere il suo substrato, una globulina alfa 2 sintetizzata dal fegato, per produrre il decapeptide angiotensina I.

L'angiotensina I è scissa rapidamente dall'attività dell'enzima convertente, principalmente nei polmoni, nell'angiotensina II, un ottapeptide biologicamente attivo. A sua volta l'angiotensina II degrada velocemente in frammenti peptidici, inattivi per azione di enzimi presenti nel plasma e nei tessuti, noti con il nome di angiotensinasi. Il percorso metabolico del sistema renina-angiotensina viene descritto di seguito:

substrato di renina
renina
↓
angiotensina I
enzima convertente
↓
angiotensina II
angiotensinasi
↓
frammenti peptidici inattivi

L'angiotensina II è caratterizzata da una emivita *in vivo* estremamente breve, ma è la sostanza vasopressoria più potente conosciuta. L'angiotensina II esplica la sua funzione in numerose forme di ipertensione, nonché nella regolazione pressoria nel sangue. È stato inoltre riscontrato che l'angiotensina II è la sostanza che influisce maggiormente sulla secrezione di aldosterone da parte della ghiandola surrenale.

Difficoltà tecniche associate alla misurazione dei livelli dell'angiotensina II nel sangue sono responsabili del ritardo con cui l'analisi relativa è stata accettata nei laboratori clinici. Poiché i livelli di angiotensina II rispecchiano direttamente l'attività della renina plasmatica, la determinazione dell'attività della renina plasmatica è stata adottata diffusamente per valutare il sistema renina-angiotensina in condizioni patologiche. La misurazione dell'attività della renina plasmatica nei casi di ipertensione è un ausilio importante nella diagnosi differenziale dell'aldosteronismo primario e secondario. La valutazione dell'attività della renina è preziosa anche nella determinazione della prognosi e della terapia più opportuna per individui affetti da ipertensione essenziale

Sono state descritte un'analisi radioimmunologica dell'angiotensina I e le sue applicazioni quali indici dell'attività della renina plasmatica.[1] La procedura relativa al kit GammaCoat per la determinazione dell'attività della renina plasmatica è stata adattata sulla base di questo metodo.

3. PRINICIPI DELL'ANALISI

La procedura si basa sui principi del legame competitivo dell'analisi radioimmunologica.[2] Nel GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity RIA Kit l'anticorpo è immobilizzato sulla parete interna inferiore della provetta GammaCoat. La determinazione dell'ARP prevede una incubazione iniziale del plasma, volta a generare angiotensina I, seguita dalla quantificazione dell'angiotensina I mediante analisi radioimmunologica. La produzione di angiotensina I nel sistema del substrato umano è dettata da:

3.1 pH dell'incubazione
3.2 entità della diluizione del plasma
3.3 scelta degli agenti inibitori enzimatici

3.4 fattori sconosciuti presenti in ciascun campione individuale di plasma, quali la concentrazione del livello del substrato di renina

3.5 durata dell'incubazione

3.6 temperatura dell'incubazione.

Il pH per la generazione
Il rapporto di generazione dell'angiotensina I *in vitro* dipende dal pH. La procedura del presente kit adotta un pH per la generazione pari a 6,0, il consueto pH dei campioni dopo l'aggiunta del buffer a pH 5,7. Il vantaggio di un'incubazione a pH 6,0 piuttosto che a pH fisiologico 7, risulta nel raddoppio del rapporto di generazione dell'angiotensina I, con conseguente migliore sensibilità per campioni a basso contenuto di renina.[3-14] Come conseguenza dell'ottimizzazione, possono essere utilizzati tempi più brevi per la generazione.

Scelta dell'inibitore dell'enzima
Può essere utilizzata tutta una serie di agenti atti a bloccare la conversione enzimatica dell'angiotensina I in angiotensina II nonché a prevenire il degrado proteolitico durante la produzione di angiotensina I.[15-17] Il fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) è l'inibitore utilizzato nella presente procedura.

Effetti della diluizione del plasma
La diluizione del plasma deve essere evitata, poiché la reazione della renina è substrato-dipendente alla concentrazione del substrato di renina che generalmente è presente nel plasma. Gli effetti della diluizione del substrato possono essere osservati ad ogni intervallo durante la generazione ed effetti più marcati si osservano in presenza di una diluizione maggiore.[4]

Durata della generazione
Per determinare l'attività enzimatica dovrebbe essere scelto l'intervallo di tempo più breve possibile, per ottenere la stima migliore della velocità iniziale della reazione e per ridurre al minimo il consumo del substrato. L'analisi radioimmunologica dell'angiotensina I è sufficientemente sensibile da consentire di determinare l'ARP avvalendosi delle condizioni ottimizzate della generazione di angiotensina I a pH 6,0.
Il metodo del GammaCoat Plasma Renin Activity Kit è caratterizzato da un tempo di generazione inferiore, poiché il campione di plasma è diluito meno possibile, portato ad un pH ottimale ed analizzato con un inibitore efficace dal pH prescelto. È stato suggerito che campioni a livello basso possono essere quantificati generando i campioni per diciotto ore e quindi eseguendo l'analisi.[4]

Durata dell'analisi radioimmunologica
Con il metodo GammaCoat Plasma Renin Activity Kit la durata dell'incubazione dell'analisi radioimmunologica è di tre ore. I risultati sono disponibili entro la stessa giornata lavorativa.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Provette rivestite di siero di coniglio anti-angiotensina I	1 sacchetto/100 provette	5 sacchetti/100 provette
Buffer per analisi dell'angiotensina (11x)	1 fiala/ 50 ml	6 fiale/1 ml
Buffer per la generazione di maleato per angiotensina	1 fiala/ 50 ml	2 fiale/5 ml
PMSF per angiotensina	1 fiala/ 50 ml	2 fiale/1 ml
Controllo per l'attività della renina	1 fiala/ 50 ml	6 fiale/1 ml
Calibratori dell'angiotensina (A-F)	6 fiale/1 ml	6 fiale/1 ml
Tracciante dell'angiotensina	2 fiale/5 ml	2 fiale/5 ml
Numero di test	100	500

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8 °C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente attenendosi alle raccomandazioni seguenti. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 [^{125}I] Tracciante dell'angiotensina I: reagente liofilizzato
Ricostituire la fiala di reagente di tracciante dell'angiotensina I[^{125}I], aggiungendo 5 ml di acqua purificata. Mescolare bene capovolgendo la fiala o agitandola su vortex. Aggiungere il contenuto di **due** fiale di tracciante a 100 ml di buffer per analisi. Il reagente del buffer tracciante è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza del kit.
In seguito alla ricostituzione, ciascuna fiala contiene circa 1 µCi di tracciante (<1 µg/ml di angiotensina I) in 5 ml di soluzione salina corretta con fosfato, con albumina di siero bovino, con l'aggiunta di thimerosal (etilmercuriotiosalicilato di sodio) quale conservante.

4.2 Provette rivestite di siero di coniglio anti-angiotensina I: reagente pronto per l'uso
Provette da 12 x 75 mm sono rivestite di siero di coniglio anti-angiotensina I (titolo <1 µg/provetta) e imballate in un sacchetto di plastica. Conservare a 2-27 °C.

4.3 Concentrato del buffer per analisi dell'angiotensina (11X): reagente concentrato
Aggiungere l'intero contenuto della fiala di concentrato del buffer per analisi a 100 ml di acqua purificata e mescolare bene. Ogni fiala contiene 10 ml di buffer di fosfato insieme allo 0,1% di sodio azide quale conservante.

4.4 Buffer per la generazione di maleato per angiotensina: reagente pronto per l'uso
Ogni fiala contiene 5 ml di buffer di maleato, EDTA di sodio, solfato di neomicina e colorante blu inerte con lo 0,1% di sodio azide quale conservante.

4.5 Fenilmetilsulfonil fluoruro per angiotensina: reagente pronto all'uso
Ogni fiala contiene 1 ml di fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) in etanolo.

4.6 Controllo per l'attività della renina: reagente liofilizzato
Ricostituire prima dell'uso dispensando 3,0 ml di acqua purificata a 2-8 °C. Tenere la fiala in un bagno di ghiaccio per 10 minuti e agitare delicatamente su vortice per mescolare bene. Suddividere le porzioni da 1,0 ml nelle provette di vetro o di plastica pre-raffreddate. Sigillare bene e conservare a -20 °C. Una porzione può essere conservata in bagno di ghiaccio o in frigorifero a 2-8 °C se l'analisi viene eseguita immediatamente.
Il controllo ricostituito deve essere conservato congelato a -20 °C e si mantiene stabile per almeno due mesi. Lo scongelamento deve avvenire in bagno di ghiaccio o in frigorifero a 2-8 °C e il controllo ricostituito **non** deve essere ricongelato dopo lo scongelamento.
Sono state osservate variazioni a carico dell'ARP in seguito all'analisi ripetuta del plasma congelato dopo diversi periodi di conservazione.[19,20] Ne consegue che l'utilizzo di plasma congelato conservato quale controllo per la determinazione dell'ARP potrebbe produrre risultati non attendibili. Il controllo dell'attività della renina viene utilizzato abitualmente durante la **generazione** dell'angiotensina I e durante l'analisi radioimmunologica, producendo un indice di controllo della qualità affidabile per l'intera analisi. Ulteriori informazioni sono fornite nella sezione Controllo di qualità.
In seguito alla ricostituzione ciascuna fiala contiene 3 ml di plasma umano elaborato con lo 0,1% di sodio azide.

4.7 Calibratori angiotensina I (A-F): reagente liofilizzato
NOTA: La prova in bianco e i calibratori sono utilizzati **soltanto** nella porzione di analisi radioimmunologica e **non devono** essere soggetti alla generazione di angiotensina I.
Ricostituire ogni fiala con 2,0 ml di acqua purificata e mescolare bene prima dell'uso. La prova in bianco e i calibratori devono quindi essere raffreddati in bagno di ghiaccio prima di condurre l'analisi. Possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di due settimane e a -20 °C per periodi più lunghi.

In seguito alla ricostituzione ogni fiala contiene 2 ml di angiotensina I, albumina di siero bovino in soluzione salina con l'aggiunta di fosfato. I calibratori sono tarati rispettivamente per 0, 0,2, 0,8, 3,0, 10,0 e 50,0 ng/ml. I calibratori DiaSorin per l'attività della renina plasmatica sono tarati mediante il lotto master di produzione corrente. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente se usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico *in vitro*, secondo le raccomandazioni pertinenti.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.
Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI ORIGINE UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata sottoposta a test secondo una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAg, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B, dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuale dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA,

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).
R32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).
S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI THIMEROSAL (ETILMERCURIOTIOSALICILATO DI SODIO)

Alcuni reagenti del presente kit contengono thimerosal (etilmercuriotiosalicilato di sodio), contenente a sua volta un composto a base di mercurio. Lo smaltimento del mercurio allo stato di elemento, inorganico, di ossidi di mercurio e composti di mercurio deve essere effettuato in piena conformità con tutte le normative locali, statali e federali.
AVVERTENZA: questo prodotto contiene una sostanza chimica nota nello Stato della California perché provoca difetti alla nascita o altri problemi di natura riproduttiva.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

Reagenti contenenti etanolo

R11 - Highly flammable (Altamente infiammabile).
S16 - Keep away from sources of ignition - No smoking (Tenere lontano da fonti di ignizione - Non fumare).
S43 - In case of fire, use dry chemical or carbon dioxide (In caso di incendio, usare agenti chimici essicati o anidride carbonica).

Reagenti contenenti PMSF
R23/24/25 - Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Tossico per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).
S36 - Wear suitable protective clothing (Indossare indumenti protettivi adatti).
S45 - In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (In caso di incidente o di malessere, richiedere immediatamente l'intervento di un medico).

Reagenti contenenti idrossido di potassio
R35 - Causes severe burns (Provoca ustioni gravi).
S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (In caso di contatto con gli occhi sciacquare immediatamente gli occhi e la pelle con acqua abbondante e rivolgersi a un medico).
S37/39 Wear suitable gloves and eye/face protection (Indossare guanti protettivi adatti e protezione per occhi/viso).

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125
Questo kit contiene materiali radioattivi che non superano i 2 µCi (74 kBq – kit CA-1533) o 10 µCi (370 kBq – kit CA-1553) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: questo prodotto contiene una sostanza chimica nota nello Stato della California perché provoca il cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

6. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il picco massimo dell'attività della renina plasmatica si registra al mattino, poiché essa è variabile durante il giorno, e i campioni devono essere raccolti regolarmente in quel momento della giornata.[18,19] Un campione di sangue venoso viene prelevato con tecnica asettica, utilizzando una provetta di vetro evacuata contenente EDTA. I campioni possono essere raccolti, trasportati e centrifugati a temperatura ambiente. Il sangue può rimanere a temperatura ambiente fino a sei ore prima della centrifugazione, senza presentare un accumulo significativo di angiotensina I. Dopo avere centrifugato il sangue, il plasma può essere conservato congelato fino al momento dell'analisi. I campioni si conservano congelati a -20 °C per un massimo di un mese. È meglio evitare i cicli di congelamento-scongelamento che possono verificarsi nei freezer con sbrinamento automatico. Sono state osservate variazioni a carico dell'ARP a causa sia della conservazione a 2-8 °C, sia della conservazione prolungata a -20 °C.[20, 21]

Prima di eseguire l'analisi, i campioni congelati devono essere scongelati rapidamente e riportati a temperatura ambiente.

È bene evitare l'uso di campioni emolizzati, lipemici o itterici. Non utilizzare l'eparina come anti-coagulante. Consultare la sezione Limiti della procedura per ulteriori precauzioni e informazioni.

7. MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

7.1 Acqua purificata.

7.2 Bagno di acqua a temperatura costante, 37 ±2°C.

7.3 Bagno di acqua ghiacciata.

7.4 Pipette volumetriche (da 1, 2, 3 e 5 ml).

7.5 Cilindro graduato (100 ml).

7.6 Pipette di precisione (da 10, 100, 500 e 1000 µl).

7.7 Contatore a raggi gamma.

7.8 Provette di plastica o vetro, da 12 x 75 mm (per la generazione di angiotensina I).

7.9 Portaprovette per test.

7.10 Miscelatore vortex (facoltativo).

7.11 Aspiratore di acqua (facoltativo).

7.12 Carta assorbente con retro in plastica (facoltativo).

8. PROCEDURA PER LA PRODUZIONE DI ANGIOTENSINA I

8.1 Trasferire 1,0 ml di plasma in una provetta **priva di rivestimento** di vetro o plastica, contrassegnata con il numero di identificazione e il suffisso 37.

8.2 Aggiungere 10 µl della soluzione di PMSF e 100 µl del buffer per la generazione di maleato (pH 6,0) a ciascuna porzione da 1,0 ml di cui al passo 1. Mescolare bene e collocare nel bagno di ghiaccio.

8.3 Trasferire 500 µl di plasma di cui al passo 2 in una provetta raffreddata corrispondente contrassegnata con il suffisso 4.

8.4 Disporre la serie 37 di provette nel bagno di acqua a 37 °C. Lasciare la serie 4 di provette nel bagno di ghiaccio. Procedere con la generazione del buffer di maleato per 90 minuti.

È stato suggerito che campioni di pazienti con valori dell'ARP inferiori a 1,0 ng/ml/ora possono essere generati durante un'incubazione di 18 ore e quindi sottoposti nuovamente ad analisi.[4] I calcoli devono essere corretti in base agli eventuali cambiamenti nella durata della produzione.

8.5 Al termine del periodo di produzione, trasferire la serie 37 di campioni nel bagno di ghiaccio, se l'analisi deve essere eseguita immediatamente, oppure nel freezer insieme alla serie 4, per un'analisi futura.

9. PROCEDURA DI ANALISI

La procedura dell'analisi comprende la preparazione di una curva di calibratore da cui verrà interpolato il contenuto di angiotensina I in entrambe le serie 37 e 4. La serie di background (la serie 4) viene quindi sottratta dai campioni della generazione 37 corrispondenti.

9.1 Aspettare che il reagente del buffer tracciante raggiunga la temperatura ambente e mescolare bene prima dell'uso. Mantenere la prova in bianco e i calibratori, il controllo generato e i campioni dei pazienti generati in un bagno di ghiaccio e mescolare bene prima dell'uso.

9.2 Etichettare una serie di provette con rivestimento Gamma in duplicato, attenendosi allo schema seguente. Con alcuni programmi di riduzione dati potrebbero essere necessari i conteggi totali [T_1,T_2] e provette B_0 [1, 2], ma questi possono essere omessi se la curva di calibratore è tracciata su carta per grafici semilogaritmica.[23-25]

Provetta N°.	Contenuto delle provette			Codice Lettera	Angiotensina I (ng/0,1 ml)
T_1,T_2	Conteggi totali (Buffer tracciante)				
1, 2	Angiotensina I prova in bianco	0	ng/ml	A	0
3, 4	Angiotensina I Calibratore	0,2	ng/ml	B	0,02
5, 6	Angiotensina I Calibratore	0,8	ng/ml	C	0,08
7, 8	Angiotensina I Calibratore	3,0	ng/ml	D	0,30
9,10	Angiotensina I Calibratore	10,0	ng/ml	E	1,0
11,12	Angiotensina I Calibratore	50,0	ng/ml	F	5,0
13,14	Controllo dell'attività della renina, Generazione a 37°C				
15,16	Controllo dell'attività della renina, Generazione a 4 °C				
17,18	Paziente “X”, Generazione a 37 °C				
19, 20	Paziente “X”, Generazione a 4 °C				

9.3 Dispensare nelle provette duplicate appropriate:

- **a.** 100 µl di prova in bianco o calibratore di angiotensina I .
- **b.** 100 µl del controllo dell'attività della renina, generazione “37” e “4”, nel gruppo appropriato di 4 provette.
- **c.** 100 µl di campione paziente della serie di generazione “37” e “4” nel gruppo appropriato di 4 provette.

9.4 Aggiungere immediatamente 1,0 ml di reagente del buffer tracciante in ciascuna provetta, compresa quella relativa ai conteggi totali. Mescolare i reagenti delicatamente, ponendo ogni provetta su vortex.

9.5 Lasciare in incubazione tutte le provette a temperatura ambiente (20-27 °C) per tre ore.

9.6 Aspirare o lasciar decantare tutte le provette, eccetto quelle per il conteggio totale.

UNA RIMOZIONE NON CORRETTA DELLA SOLUZIONE DI ADERENZA PUÒ ESSERE CAUSA DI REPLICAZIONE SCADENTE E DI VALORI ERRATI.

Se si impiega la tecnica di aspirazione, controllare che la punta in plastica dell'aspiratore tocchi il fondo della provetta rivestita e che tutto il liquido venga rimosso.

Se si usa la tecnica di decantazione, lasciar svuotare le provette in posizione capovolta per 3-5 minuti. Battere le provette su carta assorbente per eliminare eventuali liquidi di aderenza prima di riportare le provette in posizione verticale.

9.7 Contare tutte le provette in un contatore a raggi gamma per 1 minuto con la finestra opportunamente regolata per iodio-125.

9.8 Calcolare i risultati. Fare riferimento alla sezione Risultati.

10. CONTROLLO DI QUALITÀ

Il kit è dotato di un controllo dell'attività della renina. Si veda l'etichetta della fiala per il valore nominale. Il controllo deve essere sottoposto a generazione prima dell'analisi.
Ogni laboratorio dovrebbe utilizzare controlli a vari livelli per monitorare le performance. I controlli devono essere considerati come campioni non noti. Conservare le tabelle per il controllo della qualità al fine di verificare le performance dei controlli. Adottare metodi statistici adeguati per valutare i trend. Limiti accettabili per le performance verranno stabiliti da ogni singolo laboratorio.[22, 23]

11. RISULTATI

11.1 Registrare i conteggi per minuto (CPM) per ogni provetta.

11.2 Tracciare il valore CPM per i calibratori dell'angiotensina I (asse verticale) in rapporto ai nanogrammi (ng) di angiotensina I aggiunti in ogni provetta (asse orizzontale) su carta per grafici semi-logaritmici.

11.3 Tracciare la miglior curva di interpolazione. Per dati tipici fare riferimento alla TABELLA I. La FIGURA 1 illustra una curva di calibratore tipica.

11.4 Localizzare il legame CPM per ogni provetta corrispondente ad ogni campione sull'asse verticale e seguire la linea orizzontale che interseca la curva di calibrazione. Nel punto di intersezione leggere i ng di angiotensina I sull'asse orizzontale. Per ciascun campione e controllo determinare i ng medi per la serie "37" e "4".

12. ATTIVITÀ DELLA RENINA PLASMATICA (ARP)

L'attività della renina plasmatica (ARP) si esprime in ng/ml/ora di angiotensina I generata. Le correlazioni matematiche seguenti hanno lo scopo di ottenere il dato ng/ml/ora:

12.1 Sottrarre il valore medio per la serie "4" (background) dal valore medio per la serie "37" (generata):

Netto ng = ng "37" – ng "4"

12.2 Dimensioni del campione analizzato nella provetta rivestita (C): 0,1 ml_C

12.3 Diluizione del campione (S) per effetto del buffer di generazione (B) e dell'inibitore (I):

$$\frac{(1{,}0\ ml_S + 0{,}1 ml_B) + 0{,}01 ml_I}{1{,}0\ ml_S} = \frac{1{,}11 ml_{Finale}}{1{,}00\ ml_{Iniziale}}$$

12.4 Tempo necessario per la generazione dell'angiotensina I: 1,5 ore

NOTA: Se viene modificato il tempo necessario per la generazione, la modifica corrispondente deve essere apportata a questo numero.

12.5 Calcolo della generazione del maleato:

$$ARP = \frac{\left(\frac{ng\ "37" - ng\ "4"}{0{,}1 ml_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11 ml}{1{,}00\ ml}\right)}{1{,}5\ ore}$$

ARP = (7,40/ml/ora) x (ng netto)

Esempio: Campione di plasma del paziente "X":

ARP = (0,41 - 0,08) ng x (7,40/ml/ora)

ARP = 2,44 ng/ml/ora

TABELLA I
Registrazione dei dati
Non usare per calcolare campioni non noti

Provetta N°	Contenuto delle provette	CPM limite	Livello di angiotensina I (ng/ provetta)	ARP finale (ng/ml/ora)
T_1	Conteggi totali (buffer tracciante)	29242	–	–
T_2	Conteggi totali (buffer tracciante)	28992	–	–
1	Angiotensina I prova in bianco 0 ng/provetta	13617	–	–
2	Angiotensina I prova in bianco 0 ng/provetta	13048	–	–
3	Angiotensina I Calibratore 0,02 ng/provetta	13163	–	–
4	Angiotensina I Calibratore 0,02 ng/provetta	12625	–	–
5	Angiotensina I Calibratore 0,08 ng/provetta	11305	–	–
6	Angiotensina I Calibratore 0,08 ng/provetta	11291	–	–
7	Angiotensina I Calibratore 0,3 ng/provetta	6991	–	–
8	Angiotensina I Calibratore 0,3 ng/provetta	7110	–	–
9	Angiotensina I Calibratore 1,0 ng/provetta	3053	–	–
10	Angiotensina I Calibratore 1,0 ng/provetta	3056	–	–
11	Angiotensina I Calibratore 5,0 ng/provetta	1307	–	–
12	Angiotensina I Calibratore 5,0 ng/provetta	1232	–	–
13	Controllo attività renina, 37 °C	3149	0,97	
14	Controllo attività renina, 37 °C	3053	1,01	
		Media:	0,99	
15	Controllo attività renina, 4 °C	8674	0,20	
16	Controllo attività renina, 4 °C	8607	0,20	
		Media:	0,20	5,85
17	Campione di plasma del paziente “X”, 37 °C	4362	0,41	
18	Campione di plasma del paziente “X”, 37 °C	4459	0,40	
		Media:	0,41	
19	Campione di plasma del paziente “X”, 4 °C	8546	0,08	
20	Campione di plasma del paziente “X”, 4 °C	8557	0,08	
		Media:	0,08	2,44

Curva di calibratore tipica
Non usare per calcolare campioni non noti

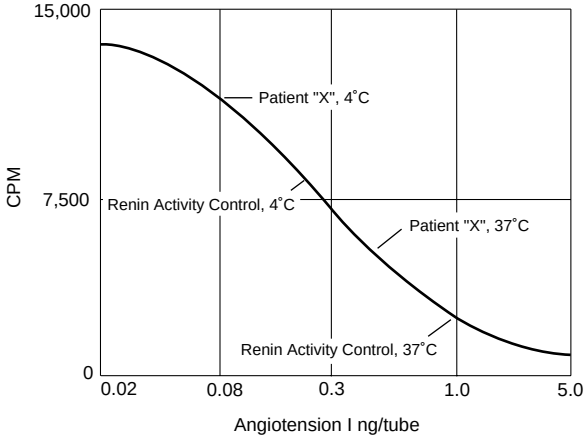


FIGURA 1

13. LIMITI DELLA PROCEDURA

Relativi alla procedura

13.1 Il sacchetto di plastica contenente le provette rivestite deve essere chiuso accuratamente per la conservazione delle provette non utilizzate e mantenuto alla temperatura di 2-27 °C.

13.2 Il livello dell'acqua deve essere mantenuto al di sopra di quello della soluzione contenuta nelle provette, senza consentire alle provette di galleggiare.

13.3 L'utilizzatore deve essere consapevole del fatto che risultati errati possono essere originati dal trattamento non idoneo dei campioni dei pazienti.

13.4 È necessario prestare la massima attenzione alla temperatura dell'acqua ghiacciata, che deve essere mantenuta alla gradazione prescritta durante la raccolta e il trattamento successivo dei campioni.

13.5 I campioni congelati devono essere scongelati rapidamente a temperatura ambiente e mescolati con cura prima di essere dispensati.

13.6 È stato notato che l'eparina inibisce la reazione della renina a concentrazioni di 5 IU/ml; di conseguenza l'eparina non deve essere utilizzata quale anticoagulante nei campioni di sangue destinati all'analisi dell'attività della renina plasmatica.[5]

13.7 I campioni emolizzati contengono angiotensinasi e non devono essere utilizzati.

13.8 Dati pubblicati hanno dimostrato che la linearità della generazione dell'angiotensina I durante un periodo di generazione predeterminato, che può essere dell'ordine di trenta minuti come pure arrivare a diciotto ore, non può essere data per certa.[3] Lo scostamento da un andamento lineare può essere la regola piuttosto che l'eccezione anche in presenza di buffer controllato a qualsivoglia pH. È possibile che altri fattori oltre al pH influenzino la linearità della generazione dell'angiotensina I. Fino a quando queste variabili non saranno interamente controllabili, è necessario attendersi caratteristiche prive di linearità.

13.9 L'impossibilità di ottenere valori di controllo appropriati può essere segno di manipolazione non adeguata, trattamento improprio o deterioramento dei reagenti. Per ogni ciclo di analisi deve essere ottenuta una curva di calibratore basata su valori appropriati dei calibratori.

Interpretativi
È estremamente importante che le variabili fisiologiche, quali la postura del paziente e o l'assunzione di sodio o l'escreto di sodio nell'urina delle 24 ore siano presi in considerazione per interpretare accuratamente i risultati dell'analisi. Anche età, sesso e razza sono fattori importanti che devono essere presi in considerazione.
Cambiamenti nell'ARP possono essere influenzati da una serie di farmaci compresi diuretici, agenti bloccanti adrenergici, vasodilatatori, antiipertensivi, grandi dosi di progestine, antagonisti dell'angiotensina II, contraccettivi per bocca o estrogeni e antagonisti mineralcorticoidi. L'uso di diatrizoato come nella renografia può inoltre influenzare i valori dell'ARP. Qualora non venga tenuta in considerazione l'influenza farmacologica derivante dall'assunzione di farmaci da parte del paziente, si potrebbe giungere ad un'errata interpretazione dei valori dell'ARP.
Numerose condizioni cliniche, compresa una comune gravidanza, influenzano l'ARP. Questi fattori sono stati delineati brevemente in articoli pubblicati da numerosi ricercatori.[27-30]

14. VALORI PREVISTI

La valutazione clinica del kit per ARP in oggetto è stata effettuata da un ricercatore indipendente e i risultati sono riassunti brevemente nella sezione presente. I dati presentati intendono guidare l'utilizzatore del kit. A causa della variabilità della popolazione di pazienti, si suggerisce agli utilizzatori di produrre dati propri (per esempio ARP in relazione al normogramma dell'escreto di sodio).

14.1 Effetti dell'assunzione di sale

I campioni di plasma e la raccolta dell'urina delle 24 ore sono stati ottenuti da individui adulti normali, privi di segni evidenti di patologie cardiovascolari o renali. Ad ogni individuo era stata assegnata una dieta di cui erano noti il contenuto di sodio e potassio. Dopo un periodo di bilanciamento, sono stati raccolti i campioni di plasma per l'ARP e i campioni di urina delle 24 ore. I risultati delle analisi sono illustrati nella TABELLA II. I dati sono stati suddivisi in quattro sottogruppi sulla base del range di sodio escreto osservato: assunzione di sale *ad libitum* (75-150 mEq/24 ore.); dieta con supplemento di sale (150 mEq/24 ore.); e due diete con limitazione del sale. In circostanze cliniche di routine è possibile ottenere riduzioni modeste nell'escreto di sodio, fino a 30-75 mEq/24 ore. Il range inferiore di escreto di sodio, 0-30 mEq/24 ore, è insolito e necessita di una limitazione severa dell'assunzione di sodio. È stata osservata la relazione inversa prevista fra ARP ed escreto di sodio nell'urina. Poiché il contenuto di sale nell'alimentazione varia di zona in zona, si suggerisce di sviluppare dati relativi al rapporto ARP/escreto di sodio nei singoli laboratori.
Durante la valutazione clinica del kit in oggetto, sono stati procurati campioni provenienti da adulti ricoverati o che frequentavano ambulatori medici apparentemente privi di patologie cardiovascolari o renali. Questi individui assumevano sale *ad libitum* e non è stata intrapresa nessuna azione per controllare le loro attività. Tutti i campioni sono stati ottenuti fra le ore 8,00 e le ore 10,00. I dati derivanti dall'osservazione di questi campioni sono illustrati nella TABELLA III. Essi rientrano nel range di ARP osservato per individui con assunzione normale di sale per questa popolazione. I valori più elevati degli individui ricoverati si possono spiegare con le alterazioni nell'assunzione di sale nella dieta imposta dal cibo dell'ospedale, stress indotto dall'ambiente ospedaliero o altri fattori indeterminati.

TABELLA II
ARP con assunzione limitata di sale

Na+ Escreto mEq/24 ore	Media ±1 S.D. (ng/ml/ora)
0 - 30	16,34 ± 7,52
30 - 75	5,91 ± 1,82
75 -150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

TABELLA III
ARP con assunzione di sale ad libitum

	Media ±1 S.D. (ng/ml/ora)
Ambulatoriali nella norma casuali	1,67 ± 0,83
Non ambulatoriali nella norma	3,30 ± 1,85

14.2 Effetti della postura
Una valutazione accurata dei valori dell'ARP è soggetta alla conoscenza da parte del medico della postura dell'individuo, poiché i valori dell'ARP sono influenzati dalla posizione. Gli effetti derivanti dall'assunzione di una posizione eretta dopo una notte di sonno trascorsa in posizione supina sono illustrati nella TABELLA IV.

TABELLA IV
Effetti della postura

	Media ±1 S.D. (ng/ml/ora)
Posizione supina	1,24 ± 1,09
Posizione eretta	2,63 ± 1,32

14.3 Stimolazione da parte del furosemide
La valutazione clinica del sistema renina-angiotensina può richiedere una valutazione del cambiamento dell'ARP dopo una stimolazione. Gli effetti del furosemide sul sistema renina-angiotensina, rilevati dal cambiamento dell'ARP, sono stati determinati come illustra uno studio riassunto nella TABELLA V. In seguito alla stimolazione a base di furosemide è stato registrato un aumento considerevole dei valori dell'ARP.

TABELLA V
Stimolazione con furosemide*

	Media ±1 S.D. (ng/ml/ora)
Pre-stimolazione	2,36 ± 1,23
Post-stimolazione	6,92 ± 2,76

NOTA: Una monografia che illustra in dettaglio l'intera valutazione è disponibile su richiesta presso il nostro Centro assistenza clienti. La monografia contiene i risultati degli studi seguenti:

1. Aldosterone nell'urina in relazione all'ARP.
2. Studi sulla renina nella vena renale in pazienti affetti da ipertensione renovascolare.
3. Determinazione dell'ARP in pazienti anefrici.
4. Risultati dell'ARP in pazienti in emodialisi.
5. Profilo della renina in pazienti con ipertensione essenziale.

* Cinque ore dopo furosemide, 40 mg per os

15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

15.1 Sensibilità analitica

La sensibilità della curva di calibratore è definita come il valore individuale più piccolo che sia distinguibile da zero. È stata calcolata una stima statistica della concentrazione minima rilevabile (sensibilità) in base al metodo di D. Rodbard, (1978),[31] per trenta replicati in corrispondenza del punto zero della curva di calibratore. La sensibilità calcolata è di 0,018 ng/provetta.

15.2 Precisione

La precisione fra più cicli di analisi è stata determinata calcolando la media fra 20 analisi simultanee per campione . La precisione fra cicli di analisi è stata determinata calcolando la media fra i duplicati per 20 cicli di analisi separate.

Campione per la precisione fra più cicli di analisi	Numero di analisi	Media (ng/ml/ora)	Deviazione standard (ng/ml/ora)	Coefficiente di variazione
Vasca di plasma A	20	1,6	0,16	10,0
Vasca di plasma B	20	6,2	0,28	4,6
Vasca di plasma C	20	17,9	1,68	9,4

Campione per la precisione fra più cicli di analisi	Numero di analisi	Media (ng/ml/ora)	Deviazione standard (ng/ml/ora)	Coefficiente di variazione
Vasca di plasma A	20	1,6	0,09	5,6
Vasca di plasma B	20	10,7	0,82	7,6
Vasca di plasma C	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Avidità

La costante dell'affinità calcolata dell'antisiero del presente kit è approssimativamente di 3×10^{10} litri/ mole.

15.4 Specificità analitica

I dati sulla reattività incrociata dell'antisiero utilizzato in questo kit sono espressi come rapporto di concentrazione di angiotensina I rispetto alla concentrazione della sostanza reagente incrociata ad inibizione del 50% di legame massimo.

Composto	% di reattività incrociata
Angiotensina I	100
Tetradecapeptide*	0,02
Angiotensina II	<0,03
Angiotensina III	<0,03

* Substrato di renina sintetica.

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

KIT DE RADIOIMUNOENSAIO DA ACTIVIDADE DA RENINA PLASMÁTICA GAMMACOAT®

1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

O kit de radioimunoensaio da actividade da renina plasmática GammaCoat [^{125}I] foi concebido para ser usado na determinação quantitativa da actividade da renina plasmática (ARP) através do radioimunoensaio da angiotensina I gerada.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A renina, uma enzima proteolítica com um peso molecular de cerca de 40,000, é libertada pelas células justaglomerulares renais. A enzima actua na circulação geral para separar o seu substrato, uma globulina alfa-2 sintetizada pelo fígado, de forma a produzir a angiotensina I decapéptida.

A angiotensina I é separada rapidamente pela actividade de enzimas conversoras, principalmente nos pulmões, para a angiotensina II octapéptida biologicamente activa. Por sua vez, a angiotensina II é degradada rapidamente em fragmentos péptidos inactivos pelas enzimas presentes no plasma e nos tecidos, designadas como angiotensinases. A passagem metabólica do sistema renina angiotensina é descrita a seguir:

substrato de renina
renina
↓
angiotensina I
enzima conversora
↓
angiotensina II
angiotensinases
↓
fragmentos péptidos inactivos

A angiotensina II possui uma meia vida *in vivo* extremamente curta, mas é o vasopressor mais potente conhecido. A angiotensina II desempenha um papel importante em diversas formas da hipertensão, bem como na regulação da pressão arterial. Além disso, a angiotensina II foi considerada como sendo a principal influenciadora da secreção de aldosterona por parte da glândula adrenal.

As dificuldades técnicas associadas à medição dos níveis da angiotensina II no sangue retardaram a aceitação geral do seu ensaio nos laboratórios clínicos. Como os níveis da angiotensina I são uma representação directa da actividade da renina plasmática, a determinação da actividade da renina plasmática foi adoptada em larga escala como o meio de avaliar o sistema renina-angiotensina nos vários estados das doenças. A medição da actividade da renina plasmática nos hipertensos constitui um auxílio importante nos diferentes diagnósticos do aldosteronismo primário e secundário. A estimativa da actividade da renina também é de grande utilidade na determinação do prognóstico e das terapias mais adequadas para indivíduos que sofram de hipertensão essencial.

Foi descrito um radioimunoensaio da angiotensina I e a respectiva aplicação como indicadores da actividade da renina plasmática.[1] O procedimento do kit GammaCoat para a determinação da actividade da renina plasmática é uma adaptação desse método.

3. PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O procedimento baseia-se nos princípios de ligação competitiva do radioimunoensaio.[2] No Kit RIA da Actividade da Renina Plasmática GammaCoat [^{125}I, o anticorpo é imobilizado na parede inferior interna do tubo GammaCoat. A determinação da ARP envolve uma incubação inicial de plasma para gerar a angiotensina I, seguida por uma quantificação da angiotensina I através do radioimunoensaio. A geração da angiotensina I no sistema do substrato humano é regulada por:

3.1 pH da incubação.

3.2 extensão da diluição do plasma.

3.3 escolha dos inibidores da enzima.

3.4 factores desconhecidos em cada amostra individual de plasma tais como a concentração do nível de substrato da renina.
3.5 duração da incubação.
3.6 temperatura da incubação.

pH da Geração
A taxa de geração da angiotensina I *in vitro* depende do pH. Este procedimento usa um pH de geração de 6,0, o pH normal das amostras após a adição de pH 5,7 tampão. A vantagem da incubação com um pH 6,0, em vez de um pH 7 fisiológico, é a taxa duplicada superior de geração da angiotensina I com a correspondente sensibilidade melhorada em amostras com baixos níveis de renina.[3-14] Como resultado dessa optimização, é possível utilizar tempos de geração mais reduzidos.

Selecção do Inibidor da Enzima
É possível utilizar diversos agentes para bloquear a conversão enzimática da angiotensina I em angiotensina II e para evitar a degradação proteolítica durante a geração da angiotensina I.[15-17] O fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) é o inibidor usado neste procedimento.

Efeitos da Diluição do Plasma
A diluição do plasma deve ser evitada porque a reacção da renina é dependente do substrato na concentração do substrato de renina normalmente existente no plasma. Os efeitos da diluição do substrato podem ser observados em todos os intervalos durante a geração, sendo os efeitos mais marcados vistos em diluições mais elevadas.[4]

Duração da Geração
Deve-se empregar o tempo prático mais curto na determinação da actividade enzimática de forma a fornecer a melhor estimativa da velocidade inicial da reacção e a minimizar o consumo de substrato. O radio imuno ensaio da angiotensina I é suficientemente sensível para permitir a determinação da ARP utilizando condições optimizadas de geração da angiotensina I a um pH 6,0.
O método do Kit da Actividade da Renina Plasmática GammaCoat oferece uma duração de geração mais reduzida porque a amostra do plasma é diluída ao mínimo, tamponada a um pH optimizado e ensaiada com um inibidor eficaz no pH seleccionado. Há sugestões de que é possível quantificar amostras com níveis baixos através da geração de amostras durante dezoito horas e posterior ensaio.[4]

Duração do Radioimunoensaio
O método do Kit da Actividade da Renina Plasmática GammaCoat utiliza uma incubação do radioimunoensaio de três horas. Os resultados ficam disponíveis no mesmo dia útil.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Tubos revestidos a anti-Angiotensina I de Coelho	1 saco/100 tubos	5 sacos/100 tubos
Tampão de Ensaio da Angiotensina (11x)	1 frasco/10 mL	5 frascos/10 mL
Tampão da Geração de Maleato de Angiotensina	1 frasco/5 mL	3 frascos/5 mL
PMSF da Angiotensina	1 frasco/1 mL	2 frascos/1 mL
Controlo da actividade da renina	1 frasco/3 mL	2 frascos/3 mL
Calibradores da Angiotensina (A-F)	6 frascos/2 mL	12 frascos/2 mL
Traçador da angiotensina	2 frascos/5 mL	10 frascos/5 mL
Número de testes	100	500

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8°C. Depois de abrir, armazene cada reagente tal como recomendado a seguir. Os reagentes não devem ser utilizados após o prazo de validade no rótulo. O prazo de validade do kit é indicado no rótulo externo e corresponde ao prazo de validade do traçador.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 [^{125}I] Traçador da Angiotensina I : reagente liofilizado
Reconstitua o frasco do Traçador da Angiotensina I [^{125}I] adicionando 5 mL de água purificada. Misture bem invertendo ou misturando cuidadosamente o frasco. Adicione o conteúdo de **dois** frascos do traçador a 100 mL de tampão do ensaio. O reagente traçador-tampão é estável a 2-8°C até ao prazo de validade do kit.
Depois da reconstituição cada frasco contém cerca de 1 µCi de traçador (<1 µg/mL de Angiotensina I) em 5 mL de salina de tampão fosfato com albumina sérica bovina e timerosal adicionados como conservantes.

4.2 Tubos Revestidos a Soro Anti-Angiotensina I de Coelho: reagente pronto a usar Os tubos de 12 x 75 mm são revestidos com soro anti-angiotensina I de coelho (grau <1 µg/tubo) e estão embalados num saco de plástico. Armazene a 2-27°C.

4.3 Concentrado Tampão do Ensaio da Angiotensina (11X): reagente concentrado
Adicione a totalidade do conteúdo do frasco de concentrado tampão do ensaio a 100 mL de água purificada e misture bem. Cada frasco contém 10 mL de tampão fosfato com 0,1% de azida de sódio como conservante.

4.4 Tampão da Geração de Maleato de Angiotensina: reagente pronto a usar
Cada frasco contém 5 mL de tampão de maleato, EDTA de sódio, sulfato de neomicina e corante azul inerte com 0,1% de azida de sódio como conservante.

4.5 Fluoreto de fenilmetilsulfonil da Angiotensina: reagente pronto a usar
Cada frasco contém 1 mL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) em etanol.

4.6 Controlo da Actividade da Renina: reagente liofilizado
Faça a reconstituição antes de utilizar, pipetando 3,0 mL de água purificada a 2-8°C. Mantenha o frasco num banho de gelo durante 10 minutos e misture ou agite cuidadosamente para misturar totalmente. Estabeleça uma alíquota de porções de 1,0 mL em tubos de plástico ou de vidro previamente congelados. Aperte bem e armazene a -20°C. Pode manter uma alíquota em banho de gelo ou no frigorífico a 2-8°C se o ensaio for efectuado nesse momento.
O controlo reconstituído deve ser armazenado congelado a -20°C ficando estável pelo menos durante dois meses. A descongelação deve ser efectuada num banho de gelo ou num frigorífico a 2-8°C e o controlo reconstituído **não** deve ser novamente congelado após a descongelação.
Foram observadas variações na ARP durante a repetição de ensaios de plasma congelado após diversos períodos de armazenamento.[19,20] Por essa razão, o uso de plasma congelado armazenado como controlo nas determinações da ARP poderá levar à obtenção de resultados pouco fiáveis. O Controlo da Actividade da Renina é utilizado de forma rotineira durante a geração da Angiotensina I bem como o radioimunoensaio, constituindo-se como um indicador de controlo de qualidade fiável para a totalidade do ensaio. Consulte a secção do Controlo de Qualidade para obter mais informações.
Depois da reconstituição, cada frasco contém 3 mL de plasma humano processado com 0.1% de azida de sódio.

4.7 Calibradores da Angiotensina I (A-F): reagente liofilizado
NOTA: as amostras em branco e os calibradores são usados **apenas** em parte do radioimunoensaio e **não devem** ser submetidos à geração de angiotensina I.
Reconstitua cada frasco com 2.0 mL de água purificada e misture bem antes de usar. As amostras em branco e os calibradores deverão posteriormente ser congelados num banho de gelo antes de serem ensaiados. Podem ser armazenados a 2-8°C durante um máximo de duas semanas e a -20°C no caso de períodos de armazenamento mais prolongados.

Depois da reconstituição, cada frasco contém 2 mL de angiotensina I, BSA em salina tampão de fosfato. Os calibradores são calibrados a 0, 0,2, 0,8, 3,0, 10,0 e 50,0 ng/mL, respectivamente. Os calibradores da Actividade da Renina Plasmática da DiaSorin são calibrados utilizando o lote principal da produção actual. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras do paciente quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico *in vitro* tal como recomendado.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.
Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM MATERIAL DE FONTE HUMANA

Trate como se fossem potencialmente infecciosos.
Cada unidade de doador de soro/plasma usada na preparação deste produto foi testada por um método aprovado pela FDA e determinado como sendo não reactivo para a presença de HBsAg, anticorpo para HCV e anticorpo para HIV 1/2. Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B, do vírus da hepatite C (HCV), do vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais, usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos," (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories) 4ª ed., Maio de 1999 ou edição actual.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte "Descontaminação de drenos de pias de laboratórios para remover sais de azidas," no Manual Guia-Gestão de Segurança Nº CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)
R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.
R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.
S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

REAGENTES COM TIMEROSAL

Alguns reagentes neste kit contêm timerosal, o qual inclui um composto de mercúrio. A eliminação do mercúrio elementar, do mercúrio inorgânico, dos óxidos de mercúrio e de compostos de mercúrio deve ser feita em conformidade com as normas locais e nacionais.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico considerado pelo Estado da Califórnia como causador de deficiências à nascença ou de outros danos reprodutivos.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)

Reagentes com Etanol
R11 - Altamente inflamável.
S16 - Mantenha afastado de fontes de ignição — Não fumar.
S43 - Em caso de fogo, use um extintor químico a seco ou de dióxido de carbono.

Reagentes com PMSF
R23/24/25 - Tóxico pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.
S36 - Use roupas de protecção adequadas.
S45 - Em caso de acidente ou no caso de se sentir mal, procure um médico imediatamente.

Reagentes Com Hidróxido de Potássio
R35 - Provoca queimaduras graves.
S26 - Em caso de contacto com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure aconselhamento médico.
S37/39 - Utilize luvas adequadas e protecção para os olhos/cara.

REAGENTES COM IODO-125
Este kit contém material radioactivo que não excede 2 µCi (74 kBq – kit CA-1533) ou 10 µCi (370 kBq – kit CA-1553) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão entrou em acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

6. RECOLHA E PREPARAÇÃO DO ESPÉCIME

A actividade da renina plasmática é mais elevada de manhã devido à variação diurna na libertação da renina, devendo as amostras ser recolhidas regularmente nessa altura do dia.[18,19] É feita a recolha de uma amostra de sangue venoso assepticamente, utilizando um tubo de vidro evacuado com EDTA. As amostras podem ser recolhidas, transportadas e centrifugadas à temperatura ambiente. O sangue pode assentar à temperatura ambiente durante um máximo de seis horas antes da centrifugação sem que ocorra uma acumulação significativa de angiotensina I. Após a centrifugação do sangue, o plasma pode ser armazenado congelado até ao ensaio. As amostras devem ser congeladas a -20°C durante um mês. Os ciclos de congelação-descongelação, que podem ocorrer nos congeladores com descongelação automática, devem ser evitados. Observaram-se variações na ARP as quais se ficaram a dever ao armazenamento a 2-8°C e a um armazenamento prolongado a -20°C.[20, 21]
Antes do ensaio, as amostras congeladas devem ser descongeladas rapidamente à temperatura ambiente.
Evite o uso de amostras lipémicas, ictéricas ou com citratos. Não utilize a heparina como anticoagulante. Consulte a secção Limitações do Procedimento para ver as precauções e informações adicionais.

7. MATERIAIS NECESSÁRIOS, NÃO FORNECIDOS

7.1 Água purificada.

7.2 Banho de água a temperatura constante, 37 ± 2°C.

7.3 Banho de água gelada.

7.4 Pipetas volumétricas (1, 2, 3 e 5 mL).

7.5 Cilindro graduado (100 mL).

7.6 Pipetas de precisão (10, 100, 500 e 1000 µL).

7.7 Contador gama.

7.8 Tubos de plástico ou de vidro, 12 x 75 mm (para a geração da angiotensina I).

7.9 Suportes para tubos de ensaio.

7.10 Misturador de vórtice (opcional).

7.11 Aspirador de água (opcional).

7.12 Papel absorvente com suporte de plástico (opcional).

8. PROCEDIMENTO DE GERAÇÃO DA ANGIOTENSINA I

8.1 Transfira 1.0 mL de plasma para um tubo de plástico ou de vidro **sem revestimento** assinalado com o número de identificação e o sufixo 37.

8.2 Adicione 10 µL da solução de PMSF e 100 µL do tampão da geração de maleato (pH 6,0) a cada alíquota de 1,0 mL do passo 1. Misture bem e coloque em banho de gelo.

8.3 Transfira 500 µL de plasma do passo dois para um tubo arrefecido correspondente, assinalado com o sufixo 4.

8.4 Coloque os tubos da série 37 num banho de água a 37°C. Mantenha a série de tubos 4 em banho de gelo. Proceda ao ensaio do tampão da geração de maleato durante 90 minutos.

Tem sido sugerido que é possível gerar amostras de pacientes com valores de ARP inferiores a 1,0 ng/mL/hr numa incubação de dezoito horas, podendo ser novamente ensaiados.[4] Os cálculos devem ser ajustados a qualquer alteração que ocorra durante o período da geração.

8.5 No final do período da geração, transfira a série 37 de amostras para um banho de gelo no caso de efectuar o ensaio imediatamente ou para o congelador juntamente com a série 4 para futuros ensaios.

9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio inclui a preparação de uma curva do calibrador da qual será interpolado o conteúdo da angiotensina I desconhecida presente nas amostras das séries 37 e 4. A base (série 4) é depois subtraída às amostras de geração 37 correspondentes.

9.1 Permita que o reagente traçador-tampão atinja a temperatura ambiente e misture bem antes de usar. Mantenha as amostras em branco e os calibradores, os controlos gerados e as amostras dos pacientes geradas num banho de gelo e misture bem antes de usar.

9.2 Rotule um conjunto de tubos GammaCoat em duplicado de acordo com o esquema seguinte. Podem ser necessários tubos de contagens totais [T_1,T_2] e B_0 [1, 2] para determinados programas de redução de dados, mas poderão ser omitidos se a curva do calibrador for marcada em papel de gráfico semi-logarítmico.[23-25]

Tubo Nº.	Conteúdo dos tubos		Letra do Código	Angiotensina I (ng/0.1 mL)
T_1,T_2	Contagens Total (Traçador-Tampão)			
1, 2	Amostra em branco da angiotensina I	0 ng/mL	A	0
3, 4	Calibrador da angiotensina I	0,2 ng/mL	B	0,02
5, 6	Calibrador da angiotensina I	0,8 ng/mL	C	0,08
7, 8	Calibrador da angiotensina I	3,0 ng/mL	D	0,30
9,10	Calibrador da angiotensina I	10,0 ng/mL	E	1,0
11,12	Calibrador da angiotensina I	50,0 ng/mL	F	5,0
13,14	Controlo da actividade da renina, geração a 37°C			
15,16	Controlo da actividade da renina, geração a 4°C			
17,18	Paciente “X”, geração a 37°C			
19, 20	Paciente “X”, geração a 4°C			

9.3 Pipete para os tubos duplicados adequados:

a. 100 µL de cada amostra em branco ou calibrador da angiotensina I.

b. 100 µL do controlo de actividade da renina dos conjuntos de geração “37” e “4” ao grupo adequado de 4 tubos.

c. 100 µL de cada amostra do paciente dos conjuntos de geração “37” e “4” ao grupo adequado de 4 tubos.

9.4 Adicione imediatamente 1.0 mL de reagente traçador-tampão a cada tubo, incluindo os de Contagem Total. Misture os reagentes agitando cuidadosamente cada tubo.

9.5 Incube todos os tubos à temperatura ambiente (20-27°C) durante três horas.

9.6 Aspire ou decante todos os tubos, excepto os de Contagem Total.

A NÃO REMOÇÃO DA SOLUÇÃO ADERENTE DE FORMA ADEQUADA PODERÁ RESULTAR NUMA REPRODUÇÃO DEFICIENTE E EM VALORES FALSOS.

Se utilizar a técnica de aspiração, certifique-se de que a ponta plástica do tubo de aspiração entra em contacto com o fundo do tubo revestido e de que a totalidade do líquido é retirada.

Se utilizar a técnica de decantação, permita que os tubos sequem numa posição invertida durante 3 a 5 minutos. Passe os tubos por papel absorvente para retirar qualquer líquido que possa ter permanecido no interior antes de colocar os tubos direitos.

9.7 Conte todos os tubos num contador gama durante um minuto com a janela devidamente ajustada para iodo-125.

9.8 Calcule os resultados. Consulte a secção Resultados.

10. CONTROLO DE QUALIDADE

É fornecido um Controlo da Actividade da Renina com este kit. Consulte o rótulo do frasco para verificar o seu valor nominal. O controlo deve ser submetido à geração antes do ensaio.

Cada laboratório deve utilizar controlos em diversos níveis para monitorizar o desempenho do ensaio. Os controlos devem ser tratados como espécimes desconhecidos. Devem ser mantidas tabelas de controlo da qualidade para acompanhar o desempenho dos controlos. Devem-se usar métodos estatísticos adequados para avaliar as tendências. Os limites aceitáveis de desempenho devem ser verificados para cada laboratório individual.[22, 23]

11. RESULTADOS

11.1 Registe as contagens por minuto (CPM) ligadas a cada tubo.

11.2 Marque as CPM ligadas aos calibradores da angiotensina I (eixo vertical) em relação aos nanogramas (ng) de angiotensina I adicionados por tubo (eixo horizontal) em papel de gráfico semi-logarítmico.

11.3 Desenhe a curva que melhor se adequar. Para obter os dados típicos, consulte a TABELA I. A FIGURA 1 ilustra uma curva do calibrador típica.

11.4 Localize a CPM ligada a cada tubo que corresponda a cada amostra do eixo vertical e siga uma linha horizontal que cruze a curva do calibrador. No ponto do cruzamento, leia os ng de angiotensina I no eixo horizontal. Para cada amostra e controlo, determine os ng médios de "37" e os ng médios de "4".

12. ACTIVIDADE DA RENINA PLASMÁTICA (ARP)

A actividade da renina plasmática (ARP) é expressa em ng/mL/hr de angiotensina I gerada. Efectuam-se as seguintes correcções matemáticas para obter os ng/mL/hr:

12.1 Subtraia o valor "4" médio (Base) ao valor "37" médio (Gerado):

ng líquido = ng "37" – ng "4"

12.2 Tamanho da amostra ensaiada no tubo revestido (C): 0,1 mL_C

12.3 Diluição da amostra (S) pelo tampão (B) e pelo inibidor (I) de geração:

$$\frac{(1{,}0\ mL_S + 0{,}1 mL_B) + 0{,}01 mL_I}{1{,}0\ mL_S} = \frac{1{,}11 mL_{Final}}{1{,}00\ mL_{Inicial}}$$

12.4 Tempo de geração da angiotensina I: 1,5 horas

NOTA: Se a duração do tempo de geração for alterada, também deverá efectuar a alteração correspondente neste número.

12.5 Cálculo da Geração de Maleato:

$$ARP = \frac{\left(\frac{ng\ "37" - ng\ "4"}{0{,}1 mL_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11 mL}{1{,}00\ mL}\right)}{1{,}5\ hr}$$

ARP = (7,40/mL/hr) x (ng líquido)

Exemplo: Amostra de Plasma "X" do Paciente:

ARP = (0,41 - 0,08) ng x (7,40/mL/hr)

ARP = 2,44 ng/mL/hr

TABELA I
Registo dos Dados
Não utilize para calcular espécimes desconhecidos

Tubo Nº	Conteúdo dos Tubos	CPM Ligado	Nível de Angiotensina I (ng/tubo)	ARP Final (ng/mL/hr)
T_1	Contagem Total (Traçador-Tampão)	29242	–	–
T_2	Contagem Total (Traçador-Tampão)	28992	–	–
1	Branco da Angiotensina I 0 ng/tubo	13617	–	–
2	Branco da Angiotensina I 0 ng/tubo	13048	–	–
3	Calibrador da Angiotensina I 0,02 ng/tubo	13163	–	–
4	Calibrador da Angiotensina I 0,02 ng/tubo	12625	–	–
5	Calibrador da Angiotensina I 0,08 ng/tubo	11305	–	–
6	Calibrador da Angiotensina I 0,08 ng/tubo	11291	–	–
7	Calibrador da Angiotensina I 0,3 ng/tubo	6991	–	–
8	Calibrador da Angiotensina I 0,3 ng/tubo	7110	–	–
9	Calibrador da Angiotensina I 1,0 ng/tubo	3053	–	–
10	Calibrador da Angiotensina I 1,0 ng/tubo	3056	–	–
11	Calibrador da Angiotensina I 5,0 ng/tubo	1307	–	–
12	Calibrador da Angiotensina I 5,0 ng/tubo	1232	–	–
13	Controlo da Actividade da Renina, 37°C	3149		0,97
14	Controlo da Actividade da Renina, 37°C	3053		1,01
		Méd:	0,99	
15	Controlo da Actividade da Renina, 4°C	8674	0,20	
16	Controlo da Actividade da Renina, 4°C	8607	0,20	
		Méd:	0,20	5,85
17	Amostra de Plasma “X” do Paciente, 37°C	4362	0,41	
18	Amostra de Plasma “X” do Paciente, 37°C	4459	0,40	
		Méd:	0,41	
19	Amostra de Plasma “X” do Paciente, 4°C	8546	0,08	
20	Amostra de Plasma “X” do Paciente, 4°	8557	0,08	
		Méd:	0,08	2,44

Curva do calibrador típica
Não utilize para calcular espécimes desconhecidos

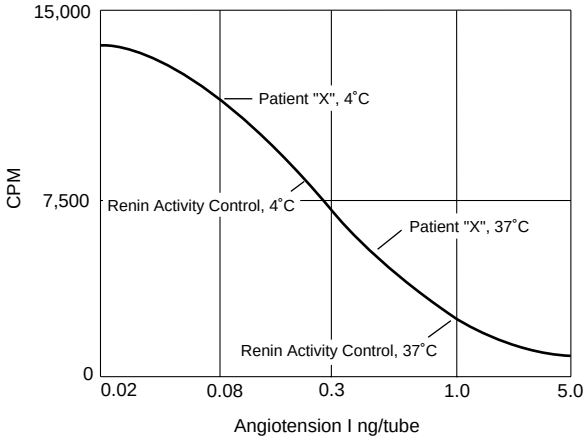


FIGURA 1

13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Processuais

13.1 O saco de plástico do tubo revestido deve ser fechado de forma segura sempre que guardar tubos não utilizados, mantendo-o a uma temperatura de 2-27°C.

13.2 O nível da água deve ser mantido acima do nível de solução nos tubos sem permitir que os tubos flutuem.

13.3 O utilizador deve ter em consideração que os resultados incorrectos podem ser provocados pelo manuseamento inadequado das amostras do paciente.

13.4 Deverá estar muito atento à manutenção da temperatura da água gelada durante a recolha e subsequente manuseamento das amostras.

13.5 As amostras congeladas devem ser rapidamente descongeladas à temperatura ambiente e bem misturadas antes de se proceder à pipetagem.

13.6 Verificou-se que a heparina inibe a reacção da renina em concentrações de 5 IU/mL; por essa razão, não deve utilizar heparina como anticoagulante nas amostras de sangue a serem ensaiadas para a actividade da renina plasmática.[5]

13.7 Os espécimes hemolisados contêm angiotensinases, não devendo, por isso, ser utilizados.

13.8 Dados publicados demonstraram que a linearidade da geração de angiotensina I durante um período de geração pré-determinado, tenha uma duração curta de trinta minutos ou uma duração mais prolongada de dezoito horas, não pode ser assumida.[3] O afastamento da linearidade poderá ser a regra e não a excepção mesmo sob um tamponamento controlado em qualquer pH. Poderá suceder que outros factores, além do pH, possam influenciar a linearidade da geração da angiotensina I. Até que tais variáveis sejam realmente controladas, parece ser necessário antecipar as características de não linearidade.

13.9 A incapacidade de obter valores adequados do controlo poderá indicar manipulações imprecisas, manuseamento inadequado ou a deterioração dos reagentes. É necessário estabelecer uma curva do calibrador para cada ensaio baseada nos valores adequados para calibradores.

Interpretativas

É essencial que as variáveis fisiológicas, tais como a postura do paciente e a ingestão de sódio ou a excreção de sódio pela urina durante 24 horas, sejam levadas em consideração para efectuar uma interpretação precisa dos resultados dos ensaios. A idade, o sexo e a raça também são factores importantes a considerar.

As alterações na ARP podem ser afectadas por um largo espectro de fármacos incluindo diuréticos, agentes bloqueadores adrenérgicos, vasodilatadores, anti-hipertensos, doses grandes de progestinas, antagonistas da angiotensina II, contraceptivos orais ou terapias com estrogénio e antagonistas mineralocorticoides. O uso de diatrizoato como, por exemplo, na renografia, também pode afectar os valores da ARP. O facto de não ser tida em consideração a contribuição farmacológica da ingestão de fármacos pelo paciente pode levar a uma interpretação errada dos valores da ARP.

Diversas condições clínicas, incluindo a gravidez normal, afectam a ARP. Estes factores foram sucintamente descritos em artigos de revistas publicados por diversos investigadores.[27-30]

14. VALORES ESPERADOS

A avaliação clínica deste kit da ARP foi efectuada por um investigador independente, sendo os resultados descritos resumidamente nesta secção. Os dados apresentados destinam-se a servir como forma de orientação para o utilizador deste kit. Devido às variações na população de pacientes, os utilizadores são aconselhados a estabelecer os seus próprios dados (por exemplo, ARP vs. Nomograma da Excreção de Sódio).

14.1 Efeito da Ingestão de Sal

As amostras de plasma e as recolhas de urina de 24 horas foram obtidas de indivíduos adultos normais sem qualquer doença cardiovascular ou renal aparente. Cada indivíduo foi submetido a uma dieta de conteúdo rico em sódio e em potássio. Após um período de equilíbrio, foram recolhidas as amostras de plasma da ARP e as amostras de urina de 24 horas. Os resultados desses estudos são apresentados na TABELA II. Os dados foram divididos em quatro subgrupos com base no intervalo da excreção de sódio observado: ingestão de sal *ad libitum* (75-150 mEq/24 hrs.); dieta suplementada com sal (150 mEq/24 hrs.); e duas dietas sem sal. É possível, em circunstâncias clínicas de rotina, obter reduções modestas na excreção de sódio, para 30-75 mEq/24 hrs. O intervalo inferior da excreção de sódio, de 0-30 mEq/24 hrs., é pouco habitual e requer uma restrição severa da ingestão de sódio. Observou-se a relação inversa prevista entre a ARP e a excreção de sódio pela urina. Como o conteúdo do sal nas dietas varia de região para região, é aconselhável que os dados da ARP vs a excreção de sódio sejam desenvolvidos pelos laboratórios individualmente.

Durante o percurso de avaliação clínica deste kit, as amostras foram recolhidas a adultos hospitalizados ou ambulatórios sem qualquer doença cardiovascular ou renal aparente. Esses adultos encontravam-se numa situação de ingestão de sal *ad libitum* , não tendo sido feito qualquer esforço para controlar as suas actividades. Todas as amostras foram obtidas entre as 8 da manhã e as 10 da manhã. Os dados obtidos nessas observações são apresentados na TABELA III. Situam-se dentro do intervalo de ARP observado nos indivíduos com uma ingestão de sal normal para esta população. Os valores mais elevados verificados nos indivíduos hospitalizados pode ser atribuído às alterações dietéticas de sal impostas pela alimentação hospitalar, pelo stress induzido pelo ambiente hospitalar ou por outros factores indeterminados.

TABELA II
ARP com Ingestão de Sal Restrita

Na+ Excreção mEq/24 hr.	D.S ±1 Médio (ng/mL/hr)
0 - 30	16,34 ± 7,52
30 - 75	5,91 ± 1,82
75 -150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

TABELA III
ARP com Ingestão de Sal ad libitum

	D.S. ±1 Médio (ng/mL/hr)
Normais Ambulatórios Aleatórios	1,67 ± 0,83
Normais não ambulatórios	3,30 ± 1,85

14.2 Efeito Posicional

A avaliação precisa dos valores da ARP depende do conhecimento do médico em relação à postura do sujeito, uma vez que os valores da ARP são afectados pela posição. O efeito de assumir uma posição erecta após uma noite de sono na posição de supino é indicado na TABELA IV.

TABELA IV
Efeito Posicional

	D.S. ±1 Médio (ng/mL/hr)
Supino	1,24 ± 1,09
Erecto	2,63 ± 1,32

14.3 Estimulação com Furosemida

A avaliação clínica do sistema renina-angiotensina pode requerer a avaliação da alteração da ARP após a estimulação. O efeito da furosemida no sistema renina-angiotensina, tal como detectado pela alteração da ARP, foi determinado da forma demonstrada por um estudo resumido na TABELA V. Verificou-se um aumento significativo nos valores da ARP devido à estimulação com furosemida.

TABELA V
Estimulação com Furosemida*

	D.S. ±1 Médio (ng/mL/hr)
Pré-estimulação	2,36 ± 1,23
Pós-estimulação	6,92 ± 2,76

NOTA: Está disponível, através de pedido para a Assistência a Clientes, uma monografia com detalhes de toda a avaliação. A monografia inclui os resultados dos seguintes estudos:

1. aldosterona na urina vs. ARP.
2. estudos da renina na veia renal em pacientes com hipertensão renovascular.
3. determinação da ARP em pacientes anéfricos.
4. resultados da ARP em pacientes sujeitos a hemodiálise.
5. perfil da renina em pacientes com hipertensão essencial.

* cinco horas após a furosemida, 40 mg p.o.

15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

15.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade da curva do calibrador é definida como o valor simples mais pequeno passível de ser distinguido de zero. Uma estimativa estatística da concentração mínima detectável (sensibilidade) foi calculada de acordo com o método de D. Rodbard, (1978),[31] para trinta réplicas no ponto zero da curva do calibrador. A sensibilidade calculada foi de 0.018 ng/tubo.

15.2 Precisão

A precisão intra-ensaio foi determinada a partir da média de vinte ensaios simultâneos por amostra. A precisão inter-ensaio foi determinada a partir da média de duplicados para vinte ensaios individuais.

Amostra da Precisão Intra-ensaio	Número de Ensaios	Média (ng/mL/hr)	Desvio Padrão (ng/mL/hr)	Coeficiente de Variação
Conjunto de Plasma A	20	1,6	0,16	10,0
Conjunto de Plasma B	20	6,2	0,28	4,6
Conjunto de Plasma C	20	17,9	1,68	9,4

Amostra da Precisão Inter-Ensaio	Número de Amostras	Média (ng/mL/hr)	Desvio Padrão (ng/mL/hr)	Coeficiente de Variação
Conjunto de Plasma A	20	1,6	0,09	5,6
Conjunto de Plasma B	20	10,7	0,82	7,6
Conjunto de Plasma C	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Grau de afinidade

A afinidade calculada constante do antisoro deste kit é de aproximadamente 3 x 10^{10} litros/mole.

15.4 Especificidade Analítica

Os dados da reactividade cruzada do antisoro usado neste kit são expressos como a relação da concentração da angiotensina I para a concentração de substância de reacção cruzada a 50% da inibição da ligação máxima.

Composto	% Reactividade Cruzada
Angiotensina I	100
Tetradecapéptido*	0,02
Angiotensina II	<0,03
Angiotensina III	<0,03

* Substrato da renina sintética,

CONSULTE A ÚLTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

GAMMACOAT® PLASMA RENIN ACTIVITY RADIOIMMUNOASSAY KIT

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK *IN VITRO*.

GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity Radioimmunoassay Kit är avsedd att användas för kvantitativ bestämning av plasmareninaktiviteten (PRA) genom radioimmunoassay av bildat angiotensin I.

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Renin är ett proteolytiskt enzym med en molekylvikt på cirka 40 000, som frisätts från de juxtaglomerulära cellerna i njuren. Dess substrat är ett alfa-2-globulin som bildas i levern, och enzymet verkar i cirkulationen genom att klyva detta substrat, så att dekapeptiden angiotensin I bildas.

Angiotensin I klyvs snabbt genom aktiviteten av konvertasenzym, främst i lungorna. Därvid bildas den biologiskt aktiva oktapeptiden angiotensin II. Angiotensin II bryts i sin tur snabbt ner till inaktiva peptidfragment, av en grupp plasma- och vävnadsenzymer som kallas angiotensinaser. De metaboliska stegen i renin-angiotensinsystemet illustreras nedan:

reninsubstrat
renin
↓
angiotensin I
konvertas
↓
angiotensin II
angiotensinaser
↓
inaktiva peptidfragment

Angiotensin II har en extremt kort halveringstid *in vivo*, men det är den mest kraftfulla vasopressor man känner till. Angiotensin II spelar en nyckelroll vid flera former av hypertension, liksom vid den fysiologiska blodtrycksregleringen. Dessutom har man kunnat visa att angiotensin II utgör den viktigaste faktorn vid regleringen av binjurens aldosteronsekretion.

De tekniska svårigheter som är förenade med mätningar av angiotensin II-halterna i blod har gjort att att de kliniska laboratorierna har väntat med att godkänna något test för det. Eftersom halterna av angiotensin I direkt speglar reninaktiviteten i plasma, har man i stor utsträckning valt att använda mätning av plasmareninaktiviten för att bedöma renin-angiotensinsystemet vid sjukdomstillstånd. Mätning av plasmareninaktiviteten hos patienter med hypertension är ett viktigt hjälpmedel för differentialdiagnostik av primär och sekundär aldosteronism. En uppskattning av reninaktivieten är även värdefull för bedömning av prognos för och lämpligaste behandling av patienter med essentiell hypertension.

En radioimmunoassay för angiotensin I och dess användning som ett index på plasmareninaktiviteten har beskrivits tidigare.[1] GammaCoat Kit-metoden för bestämning av plasmareninaktiviteten är en anpassning av denna assay.

3. ANALYSPRINCIP

Testet är baserat på principen med kompetitiv bindning i en radioimmunoassay.[2] I GammaCoat [^{125}I] Plasma Renin Activity RIA Kit är antikroppen immobiliserad på den nedre delen av innerväggen i GammaCoat-rören. Vid PRA-analysen inkuberas först plasma så att angiotensin I bildas, och därefter sker en kvantitativ bestämning av angiotensin I med radioimmunoassay. Bildningen av angiotensin I i humansubstrat-systemet styrs av:

- **3.1** pH vid inkubationen.
- **3.2** plasmans utspädningsgrad.
- **3.3** val av enzymhämmare.
- **3.4** okända faktorer i varje enskilt plasmaprov, såsom halten av reninsubstrat.
- **3.5** inkubationens varaktighet.
- **3.6** inkubationstemperatur.

pH vid angiotensinbildning
Hastigheten för angiotensin I-bildningen *in vitro* är pH-beroende. I denna sats används ett pH på 6,0, vilket är det pH som i allmänhet råder i proverna efter tillsats av bufferten med pH 5,7. Fördelen med att inkubera vid pH 6,0 i stället för det fysiologiska pH 7 är att man får en dubbelt så snabb bildning av angiotensin I, vilket i motsvarande grad förbättrar känsligheten för prover med låg reninaktivitet.[3-14] Som ett resultat av denna optimering räcker det med en kortare inkubationstid för bildning av angiotensin I.

Val av enzymhämmare
En rad olika substanser kan användas för att blockera den enzymatiska omvandlingen av angiotensin I till angiotensin II och förhindra proteolytisk nedbrytning under bildningen av angiotensin I.[15-17] I denna sats används fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF).

Effekter av plasmaspädning
Man bör undvika att späda plasmaproverna, eftersom reninreaktionen är substratberoende vid den reninhalt som vanligen råder i plasma. Effekterna av substratspädning kan ses vid alla intervall under bildandet av angiotensin I, och speciellt vid högre spädningsgrader.[4]

Tid för angiotensin I-bildning
Kortast möjliga inkubationstid bör användas för bestämningen av enzymaktiviteten. På det viset får man den bästa uppskattningen av reaktionens initialhastighet och minimerar substratförbrukningen. Radioimmunoassayen för angiotensin I är tillräckligt känslig för att möjliggöra en PRA-bestämning med optimerade betingelser för angiotensin I-bildning vid pH 6,0.
Följande faktorer gör att det med GammaCoat Plasma Renin Activity Kit räcker med en kortare tid för angiotensin I-bildning: plasmaprovet är minimalt utspätt, det är buffrat till ett optimalt pH och det körs med en hämmare som har god effekt vid det valda pH. Det har föreslagits att man skulle kunna kvantifiera låga halter genom att inkubera proverna i 18 timmar och sedan köra en assay.[4]

Tid för radioimmunoassayen
GammaCoat Plasma Renin Activity Kit behöver tre timmar för radioimmunoassay-inkubationen. Resultaten blir klara samma arbetsdag.

4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

Assayrör belagda med kaninantikroppar mot angiotensin I	1 påse à 100 rör	5 påsar à 100 rör
Buffert för angiotensinassay (11x)	1 flaska à 10 mL	5 flaskor à 10 mL
Maleatbuffert för angiotensinbildningssteget	1 flaska à 5 mL	3 flaskor à 5 mL
Angiotensin-PMSF	1 flaska à 1 mL	2 flaskor à 1 mL
Reninaktivitetskontroll	1 flaska à 3 mL	2 flaskor à 3 mL
Angiotensinkalibreringslösningar (A-F)	6 flaskor à 2 mL	12 flaskor à 2 mL
Angiotensinspårämne	2 flaskor à 5 mL	10 flaskor à 5 mL
Antal test	100	500

FÖRVARING: Oöppnad förpackning förvaras vid 2-8 °C. Öppnade reagens förvaras enligt anvisningarna för varje reagens nedan. Reagensen får ej användas efter det utgångsdatum som anges på etiketten. Utgångsdatum för satsen anges på etiketten på ytterförpackningen och motsvarar utgångsdatum för spårämnet.

Reagens från skilda batcher får ej blandas.

4.1 Spårämne - [^{125}I]-angiotensin I: frystorkat reagens
Rekonstituera flaskan med [^{125}I]-angiotensin I genom att tillsätta 5 mL renat vatten. Blanda väl genom att vända på flaskan eller vortexa den försiktigt. Tillsätt innehållet i **två** spårämnesflaskor till 100 mL assaybuffert. Blandningen av spårämne och buffert är stabil vid 2-8 °C fram till utgångsdatum för satsen.
Efter rekonstituering innehåller varje flaska cirka 1 µCi spårämne (<1 µg/mL angiotensin I) i 5 mL PBS-buffert med bovint serumalbumin, med timerosal som konserveringsmedel.

4.2 Assayrör belagda med kaninserum mot angiotensin I: reagens färdigt för användning 12 x 75 mm-rören är belagda med kaninserum mot angiotensin I (titer <1 µg/rör) och förpackade i en plastpåse. Förvaras vid 2-27 °C.

4.3 Koncentrat för angiotensinassaybuffert (11X): koncentrerat reagens
Tillsätt hela innehållet i flaskan med koncentrat till 100 mL renat vatten och blanda väl. Varje flaska innehåller 10 ml fosfatbuffert med 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

4.4 Maleatbuffert för angiotensinbildningssteget: reagens färdigt för användning
Varje flaska innehåller 5 mL maleatbuffert, natrium-EDTA, neomycinsulfat och inert blått färgämne samt 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

4.5 Fenylmetylsulfonylfluorid för angiotensin: reagens färdigt för användning
Varje flaska innehåller 1 mL of fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) i etanol.

4.6 Reninaktivitetskontroll: frystorkat reagens
Rekonstitueras före användning genom pipettering av 3,0 mL renat vatten med en temperatur av 2-8 °C. Låt flaskan stå i isbad i 10 minuter och vortexa eller sväng runt den försiktigt. Pipettera upp portioner à 1,0 mL till i förväg kylda glas- eller plaströr. Förslut rören noga och förvara vid -20 °C. En portion kan sparas i isbad eller i kylskåp vid 2-8 °C om assayen skall köras vid detta tillfälle.
Den rekonstituerade kontrollen måste förvaras fryst vid -20 °C och är stabil i minst två månader. Upptiningen måste ske i isbad eller kylskåp vid 2-8 °C och den rekonstituerade kontrollen får **inte** frysas på nytt efter upptining.
Man har sett variationer i PRA vid upprepade assayer på fryst plasma efter varierande lagringstider.[19,20] Följaktligen kan resultaten bli otillförlitliga när man använder fryst plasma som kontroll vid PRA-mätningar. Reninaktivitetskontrollen används rutinmässigt vid både angiotensin I-**bildning** och radioimmunoassay, och fungerar då som en tillförlitlig kontrollindikator på hela assayen. Se avsnittet Kvalitetskontroll för ytterligare information.
Efter rekonstituering innehåller varje flaska 3 mL behandlad human plasma med 0,1 % natriumazid.

4.7 Kalibreringslösningar med angiotensin I (A-F): frystorkat reagens
OBS! Blank och kalibreringslösningar används **endast** i radioimmunoassaydelen **och skall** inte inkuberas för angiotensin I-bildning.
Rekonstituera varje flaska med 2,0 mL renat vatten och blanda väl före användning. Blank och kalibreringslösningar skall sedan kylas i ett isbad innan de körs i assayen. De kan förvaras vid 2-8 °C i upp till två veckor, och vid -20 °C vid längre tids förvaring.

Efter rekonstituering innehåller varje flaska 2 mL angiotensin I med BSA i PBS-buffert. Kalibreringslösningarna är kalibrerade till 0; 0,2; 0,8; 3,0; 10,0 respektive 50,0 ng/mL. Kalibreringslösningarna i satsen kalibrerades med hjälp av den aktuella produktionshuvudbatchen. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover, när de används med de reagens och metodanvisningar om rekommenderas för detta diagnostiska *in vitro*-test.

5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK *IN VITRO*.
Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

Behandlas som potentiellt smittfarligt.
Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk (FDA) och befunnits negativ vad gäller förekomst av HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus, hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall alla produkter

som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder (se handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga).

REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

FÖRSIKTIGT! Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1976.

Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

REAGENS SOM INNEHÅLLER TIMEROSAL

Vissa reagens i satsen innehåller timerosal, där en kvicksilverförening ingår. Metalliskt kvicksilver, oorganiska kvicksilverföreningar, kvicksilveroxider och organiska kvicksilverföreningar måste kasseras i strikt överensstämmelse med alla lokala och nationella regler.

VARNING! Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka missbildningar eller annan reproduktiv skada.

Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)

Reagens som innehåller etanol

R11 - Mycket brandfarligt.
S16 - Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden.
S43 - Vid brandsläckning använd pulver eller koldioxid.

Reagens som innehåller PMSF

R23/24/25 - Giftigt vid inandning, hudkontakt och förtäring.
S36 - Använd lämpliga skyddskläder.
S45 - Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare.

Reagens som innehåller kaliumhydroxid

R35 - Starkt frätande.
S26 - Vid kontakt med ögonen, spola genast med mycket vatten och kontakta läkare.
S37/39 - Använd lämpliga skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 2 µCi (74 kBq - sats CA-1533) eller 10 µCi (370 kBq - sats CA-1553) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:
Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laboratorietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.

3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens:

När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

VARNING! Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka

cancer.

OBSERVERA! Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

6. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

På grund av dygnsvariationen för reninfrisättning är plasmareninaktiviteten högst på förmiddagen, och proverna bör regelmässigt tas vid denna tidpunkt.[18,19] Använd aseptisk teknik och tag venprover i rör av vacutaineryp med EDTA-tillsats. Proverna kan tas, transporteras och centrifugeras vid rumstemperatur. Blodet kan stå vid rumstemperatur i upp till sex timmar före centrifugering utan signifikant ackumulering av angiotensin I. Sedan blodet centrifugerats kan plasma förvaras i frys tills den testas. Proverna kan förvaras frysta vid -20 °C i upp till en månad. Undvik cykler med upptining och frysning, även sådana som kan förekomma i självavfrostande frysar. Man har observerat variationer i PRA orsakade både av förvaring vid 2-8 °C och av långvarig förvaring vid -20 °C.[20, 21] Före assay måste de frysta proverna snabbt tinas till rumstemperatur.

Hemolyserade, lipemiska eller ikteriska prover, eller prover med citrattillsats, bör ej användas. Använd ej heparin som koagulationshämmande medel. Se avsnittet Metodbegränsningar för ytterligare försiktighetsåtgärder och upplysningar.

7. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG MATERIEL

7.1 Renat vatten.
7.2 Vattenbad med en konstant temperatur på 37 ± 2 °C.
7.3 Isbad.
7.4 Vollpipetter (1, 2, 3 och 5 mL).
7.5 Mätglas (100 mL).
7.6 Precisionspipetter (10, 100, 500 och 1000 µL).
7.7 Gammaräknare.
7.8 Plast- eller glasrör, 12 x 75 mm (för bildning av angiotensin I).
7.9 Provrörsställ.
7.10 Vortexblandare (ej obligatoriskt).
7.11 Vattensug (ej obligatoriskt).
7.12 Absorberande papper med plastad baksida (ej obligatoriskt).

8. PROCEDUR FÖR ANGIOTENSIN I-BILDNING

8.1 Pipettera 1,0 mL plasma till ett glas- eller plaströr **utan antikroppbeläggning**. Röret skall vara märkt med patientidentifiering plus suffixet 37.

8.2 Tillsätt 10 µL PMSF-lösning och 100 µL maleatbuffert (pH 6,0) till varje 1,0 mL-prov från steg 1. Blanda väl och placera i isbad.

8.3 Pipettera 500 µL av plasman från steg 2 till ett motsvarande, kylt rör märkt med suffixet 4.

8.4 Placera rören i 37-serien i ett vattenbad vid 37 °C. Låt rören i 4-serien stå kvar i isbadet. Låt angiotensinbildning i maleatbufferten pågå i 90 minuter.

Det har föreslagits att patientprover med PRA-värden under 1,0 ng/mL/h kan köras med en angiotensinbildning som får pågå i 18 timmar och därefter testas på nytt.[4] Vid alla ändringar av angiotensinbildningstiden måste beräkningarna justeras.

8.5 När bildningsinkuberingen är avslutad flyttar man rören i 37-serien till isbadet om assayen skall köras genast, alternativt till frys tillsammans med rören i 4-serien för assay vid ett senare tillfälle.

9. TESTPROCEDUR

I assayproceduren ingår framtagning av en kalibreringskurva i vilken man avläser den okända angiotensin I-halten för rören i både 37-serien och 4-serien. Bakgrundsvärdena (rören i 4-serien) subtraheras sedan från motsvarande värden för rören i 37-serien.

9.1 Låt det beredda spårämnesreagenset anta rumstemperatur och blanda det väl före användning. Låt blank och kalibreringslösningar, samt kontroll och patientprover som genomgått angiotensinbildning stå på isbad, och blanda dem väl före användning.

9.2 Märk upp GammaCoat-rör för dubbelprover enligt följande schema. Rören för totalaktivitet [T_1,T_2] och B_0 [1, 2] kan krävas för vissa datareduktionsprogram, men kan även uteslutas om kalibreringskurvan plottas på lin-log-papper.[23-25]

Rör nr	Innehåll i rören			Kod-bokstav	Angiotensin I (ng/0,1 mL)
T_1,T_2	Totalaktivitet (Berett spårämne)				
1, 2	Angiotensin I-blank	0	ng/mL	A	0
3, 4	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,2	ng/mL	B	0,02
5, 6	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,8	ng/mL	C	0,08
7, 8	Angiotensin I-kalibreringslösning	3,0	ng/mL	D	0,30
9,10	Angiotensin I-kalibreringslösning	10,0	ng/mL	E	1,0
11,12	Angiotensin I-kalibreringslösning	50,0	ng/mL	F	5,0
13,14	Reninaktivitetskontroll, 37 °C angiotensinbildning				
15,16	Reninaktivitetskontroll, 4 °C angiotensinbildning				
17,18	Patient "X", 37 °C angiotensinbildning				
19, 20	Patient "X", 4 °C angiotensinbildning				

9.3 Pipettera till respektive dubbelprovsrör:

- **a.** 100 µL av varje angiotensin I-blank eller kalibreringslösning.
- **b.** 100 µL reninaktivitetskontroll som genomgått angiotensinbildning vid "37 °C" respektive "4 °C". Två rör för vardera temperaturen ger en grupp på fyra rör.
- **c.** 100 µL från "37"-röret respektive "4"-röret för varje patientprov. Två rör för vardera ger en grupp på fyra rör.

9.4 Tillsätt genast 1,0 mL berett spårämnesreagens till varje rör, inklusive totalaktivitetsrören. Blanda reagensen genom att försiktigt vortexa varje rör.

9.5 Inkubera alla rör vid rumstemperatur (20-27 °C) i tre timmar.

9.6 Sug bort eller dekantera vätskan i alla rör utom totalaktivitet.

OM INTE LÖSNING SOM HÄFTAR VID RÖRVÄGGARNA AVLÄGSNAS PÅ KORREKT SÄTT KAN MAN FÅ DÅLIG REPRODUCERBARHET OCH FELAKTIGA VÄRDEN.

Om man väljer att suga bort vätskan måste man se till att plastspetsen på sugen vidrör botten på det belagda röret och att all vätska sugs bort.

Om man väljer att dekantera skall man låta rören stå upp och ned och droppa av i 3-5 minuter. Knacka rören mot absorberande papper för att få bort all vidhäftande vätska och vänd dem sedan rätt igen.

9.7 Räkna alla rör 1 minut i en gammaräknare med fönstret korrekt inställt för jod-125.

9.8 Beräkna resultaten. Se avsnittet Resultat.

10. KVALITETSKONTROLL

En reninaktivitetskontroll medföljer i satsen. Se etiketten på flaskan för dess nominella värde. Kontrollen måste genomgå inkubering för angiotensinbildning innan den körs i assayen.

Varje laboratorium bör använda kontroller med flera olika nivåer för att följa upp testets prestanda. Kontrollerna skall behandlas som okända prov. Man bör kontinuerligt föra in kontrollvärdena i ett diagram för att kunna följa hur väl kontrollerna ligger. Lämpliga statistiska metoder skall användas för att utvärdera trenderna. Varje enskilt laboratorium bör fastställa godtagbara prestandagränser.[22, 23]

11. RESULTAT

11.1 Anteckna den bundna aktiviteten i CPM för varje rör.

11.2 Plotta bunden aktivitet (CPM) för kalibreringslösningarna (lodrät axel) mot mängden tillsatt angiotensin I (ng) per rör (vågrät axel) på ett lin-log-papper.

11.3 Rita in den kurva som passar bäst till punkterna. För ett typiskt exempel på mätdata hänvisar vi till Tabell I. FIGUR 1 visar en typisk kalibreringskurva.

11.4 Gå in på den lodräta axeln vid CPM-värdet för varje prov och följ en vågrät linje tills den skär kalibreringskurvan. Från den punkt där linjen skär kurvan går man ner och läser av ng angiotensin I på den vågräta axeln. Bestäm medelvärdena i ng för de båda "37"-rören respektive de båda "4"-rören för varje prov och kontroll.

12. PLASMARENINAKTIVITETEN (PRA)

Plasmareninaktiviteten (PRA) uttrycks som ng/mL/h bildat angiotensin I. Utför följande matematiska korrigeringar för att få fram ng/mL/h:

12.1 Subtrahera medelvärdet för "4" (bakgrunden) från medelvärdet för "37" (nybildat):

Netto-ng = "37"-ng - "4"-ng

12.2 Volym för provet som testades i röret med beläggning (C): 0,1 mL_C

12.3 Utspädning av provet (S) från maleatbuffert (B) och hämmare (I):

$$\frac{(1{,}0\ mL_S + 0{,}1 mL_B) + 0{,}01 mL_I}{1{,}0\ mL_S} = \frac{1{,}11 mL_{Slutlig}}{1{,}00\ mL_{Initial}}$$

12.4 Tid för angiotensin I-bildningen: 1,5 h

OBS! Om tiden för bildningsinkubationen ändras, måste denna siffra ändras på motsvarande sätt.

12.5 Beräkning av bildat angiotensin I i maleatbufferten:

$$PRA = \frac{\left(\frac{ng\,"37" - ng\,"4"}{0{,}1\,mL_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11\,mL}{1{,}00\,mL}\right)}{1{,}5\,h}$$

PRA = (7,40/mL/h) x (netto-ng)

Exempel: Plasmaprovet för patient "X":

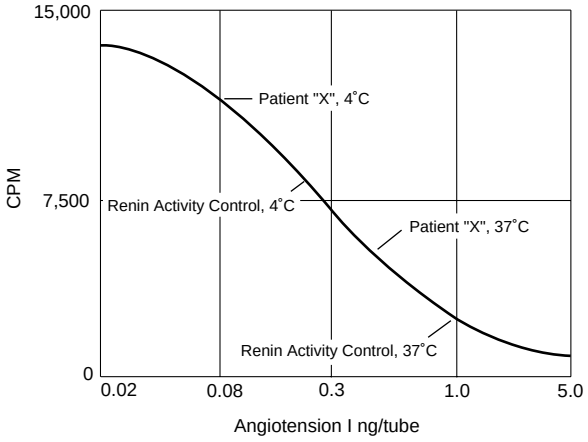
PRA = (0,41 - 0,08) ng x (7,40/mL/h)

PRA = 2,44 ng/mL/h

TABELL I
Hur man antecknar data
Använd inte detta diagram för att beräkna okända prover

Rör nr.	Innehåll i rören			CPM bunden aktivitet	Mängd Angiotensin I (ng/rör)	Slutligt PRA (ng/mL/h)
T_1	Totalaktivitet (Berett spårämne)			29242	-	-
T_2	Totalaktivitet (Berett spårämne)			28992	-	-
1	Angiotensin I-blank	0	ng/rör	13617	-	-
2	Angiotensin I-blank	0	ng/rör	13048	-	-
3	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,02	ng/rör	13163	-	-
4	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,02	ng/rör	12625	-	-
5	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,08	ng/rör	11305	-	-
6	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,08	ng/rör	11291	-	-
7	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,3	ng/rör	6991	-	-
8	Angiotensin I-kalibreringslösning	0,3	ng/rör	7110	-	-
9	Angiotensin I-kalibreringslösning	1,0	ng/rör	3053	-	-
10	Angiotensin I-kalibreringslösning	1,0	ng/rör	3056	-	-
11	Angiotensin I-kalibreringslösning	5,0	ng/rör	1307	-	-
12	Angiotensin I-kalibreringslösning	5,0	ng/rör	1232	-	-
13	Reninaktivitetskontroll, 37 °C			3149	0,97	
14	Reninaktivitetskontroll, 37 °C			3053	1,01	
					medel:0,99	
15	Reninaktivitetskontroll, 4 °C			8674	0,20	
16	Reninaktivitetskontroll, 4 °C			8607	0,20	
					medel:0,20	5,85
17	Plasmaprov Patient "X", 37 °C			4362	0,41	
18	Plasmaprov Patient "X", 37 °C			4459	0,40	
					medel:0,41	
19	Plasmaprov Patient "X", 4 °C			8546	0,08	
20	Plasmaprov Patient "X", 4 °C			8557	0,08	
					medel:0,08	2,44

Typisk kalibreringskurva
Använd inte detta diagram för att beräkna okända prov



FIGUR 1

13. METODBEGRÄNSNINGAR

Procedurmässiga

13.1 Plastpåsen med oanvända rör med beläggning måste förslutas noggrant och förvaras vid 2-27 °C.

13.2 Vattennivån måste hållas över ytan på lösningen i rören utan att rören börjar flyta.

13.3 Användaren måste vara medveten om att felaktiga resultat kan bero på att proverna förvarats eller hanterats felaktigt.

13.4 Man måste vara mycket noga med att isbadet håller rätt temperatur under provtagning och fortsatt provhantering.

13.5 Frysta prover skall tinas snabbt till rumstemperatur och blandas omsorgsfullt innan de pipetteras.

13.6 Det har visat sig att heparin hämmar reninreaktionen i halter på 5 IE/mL; följaktligen bör heparin ej användas som koagulationshämmande medel i blodprov där plasmareninaktiviteten skall analyseras.[5]

13.7 Hemolyserade prover innehåller angiotensinaser och bör ej användas.

13.8 Publicerade data uppvisade evidens för att man inte kan förutsätta linearitet för angiotensin I-bildningen under en förutbestämd bildningstid, även om den är så kort som 30 minuter eller så lång som 18 timmar.[3] Avvikelse från en rät linje kan vara regel snarare än undantag, även vid kontrollerad buffring vid vilket pH som helst. Det kan vara så att andra faktorer än pH kan påverka linearitеten hos angiotensin I-bildningen. Tills det går att kontrollera dessa variabler verkar det nödvändigt att räkna med en icke-linjär karakteristik.

13.9 Icke-korrekta värden för kontrollen kan tyda på bristande noggranhet vid pipetteringen, felaktig hantering eller för gamla reagens. En kalibreringskurva skall ritas upp för varje körning, baserad på värdena för kalibreringslösningarna.

Tolkningsmässiga

För att tolka assyresultaten korrekt är det viktigt att ta hänsyn till fysiologiska variabler, som patientens kroppställning och antingen intaget av natrium eller dygnsutsöndringen av natrium i urinen. Ålder, kön och ras är också viktiga faktorer att ta hänsyn till.

Förändringar i PRA kan framkallas av ett spektrum av läkemedel, t.ex. diuretika, adrenerga blockerare, vasodilatorer, antihypertensiva, stora doser av progestiner, angiotensin II-antagonister, perorala antikonceptionsmedel eller östrogenbehandling, samt mineralkortikoidantagonister. Användning av diatrizoat vid exempelvis renografi kan också påverka PRA-värdena. Om man underlåter att ta hänsyn till farmakologiska effekter från patientens läkemedel kan detta leda till en felaktig tolkning av PRA-värdena.

Olika kliniska tillstånd, inklusive en normal graviditet, påverkar också PRA. Dessa faktorer finns sammanfattade i översiktsartiklar av flera forskare.[27-30]

14. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Denna PRA-sats har utvärderats av en oberoende forskare och resultaten sammanfattas i detta avsnitt. Presenterade data är avsedda som en vägledning för användaren. På grund av variationerna mellan olika patientpopulationer rekommenderar vi att användarna upprättar egna data (exempelvis ett nomogram för PRA/. natriumutsöndring).

14.1 Effekter av saltintag

Plasmaprover och 24-timmarsurin insamlades från friska vuxna försökspersoner utan synbar hjärtkärl- eller njursjukdom. Varje försöksperson sattes på en diet med känt natrium- och kaliuminnehåll. Efter en jämviktningsperiod insamlades plasmaprover för PRA, och 24-timmarsurinprov. Resultaten från dessa studier redovisas i TABELL II. Data delades in i fyra undergrupper baserat på observerade natriumutsöndringsvärden: saltintag *ad libitum* (75-150 mEq/24 h); diet med salttillskott (150 mEq/24 h); och två dieter med saltrestriktioner. Under kliniska förhållanden kan man åstadkomma måttliga reduktioner av natriumutsöndringen, till 30-75 mEq/24 h. Det lägre intervallet för natriumutsöndring, 0-30 mEq/24 h, är ovanligt och kräver stränga restriktioner för natriumintag. Det förväntade omvända sambandet mellan PRA och natriumutsöndringen i urin observerades. Eftersom saltmängden i kosten varierar regionalt, rekommenderar vi att varje enskilt laboratorium tar fram data för PRA vs. natriumutsöndring.

Under den kliniska utvärderingen av denna sats insamlades prov från ambulanta eller sjukhusintagna vuxna utan synbar hjärtkärl- eller njursjukdom. Dessa patienter fick inta salt *ad libitum* och man vidtog inte några åtgärder för att reglera deras aktiviteter. Alla prov togs mellan 8:00 och 10:00. Data från dessa observationer återfinns i TABELL III. De faller inom det PRA-område som iakttogs för personer med normalt saltintag för denna population. De högre värdena för personer intagna på sjukhus kan tillskrivas de förändringar i saltintag som följer med storköksmat, den stress som sjukhusmiljön utövar eller andra, ej fastställda, faktorer.

TABELL II
PRA med restriktioner för saltintag

Na+-utsöndring mEq/24 h	Medelvärde ±1 S.D. (ng/mL/h)
0 - 30	16,34 ± 7,52
30 - 75	5,91 ± 1,82
75 -150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

TABELL III
PRA med salt ad libitum

	Medelvärde ±1 S.D. (ng/mL/h)
Slumpmässigt utvalda ambulanta normalpersoner	1,67 ± 0,83
Icke-ambulanta normalpersoner	3,30 ± 1,85

14.2 Effekt av kroppsställning
För en korrekt bedömning av PRA-värdena krävs det att läkaren har kännedom om patientens kroppsställning, eftersom värdena påverkas av denna. Effekten av att resa sig till stående efter en natts sömn i liggande ställning framgår av TABELL IV.

TABELL IV
Effekt av kroppsställning

	Medelvärde ±1 S.D. (ng/mL/h)
Liggande	1,24 ± 1,09
Stående	2,63 ± 1,32

14.3 Furosemidstimulering
För en klinisk bedömning av renin-angiotensinsystemet kan det krävas att man mäter PRA-förändringen efter stimulering. Effekten av furosemid på renin-angiotensinsystemet, påvisad som en förändring av PRA, bestämdes i en studie som sammanfattas i TABELL V. Det förelåg en signifikant höjning av PRA-värdena vid furosemidstimulering.

TABELL V
Furosemidstimulering*

	Medelvärde ±1 S.D. (ng/mL/h)
Före stimulering	2,36 ± 1,23
Efter stimulering	6,92 ± 2,76

OBS! En monografi med alla detaljer kring hela utvärderingen kan på begäran erhållas från vår kundtjänst. Monografin innehåller resultat från följande studier:

1. urin-aldosteron vs. PRA.
2. studier av renin i njurvenerna på patienter med renovaskulär hypertension.
3. PRA-bestämningar på anefriska patienter.
4. PRA-resultat från patienter på hemodialys.
5. reninprofilering av patienter med essentiell hypertension.

* 5 h efter furosemid, 40 mg p.o.

15. SPECIFIKA PRESTANDA

15.1 Analytisk känslighet

Kalibreringskurvans känslighet definieras som det lägsta enskilda värde som kan särskiljas från noll. En statistisk uppskattning av den lägsta påvisbara halten (känsligheten) beräknades med metoden enligt D. Rodbard, (1978),[31] för 30 replikat vid kalibreringskurvans nollpunkt. Den beräknade känsligheten är 0,018 ng/rör.

15.2 Precision

Den intraseriella precisionen bestämdes från medelvärdet av 20 samtidiga tester av varje prov. Den interseriella precisionen bestämdes från det genomsnittliga medelvärdet för dubbelprov vid 20 separata körningar.

Prov för intraseriell precision	Antal assayer	Medelvärde (ng/mL/h)	Standardavvikelse (ng/mL/h)	Variationskoefficient
Plasmapool A	20	1,6	0,16	10,0
Plasmapool B	20	6,2	0,28	4,6
Plasmapool C	20	17,9	1,68	9,4

Prov för interseriell precision	Antal assayer	Medelvärde (ng/mL/h)	Standardavvikelse (ng/mL/h)	Variationskoefficient
Plasmapool A	20	1,6	0,09	5,6
Plasmapool B	20	10,7	0,82	7,6
Plasmapool C	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Aviditet

Den beräknade affinitetskoefficienten för satsens antiserum är cirka 3 x 10^{10} liter/ mol.

15.4 Analytisk specificitet

Data för korsreaktiviteten för det antiserum som används i satsen uttrycks som kvoten mellan koncentrationen av angiotensin I och koncentrationen av det korsreagerande ämnet vid 50 % hämning av maximal bindning.

Förening	% korsreaktivitet
Angiotensin I	100
Tetradekapeptid*	0,02
Angiotensin II	<0,03
Angiotensin III	<0,03

* Syntetiskt reninsubstrat.

FÖR REFERENSER HÄNVISAS TILL SISTA SIDAN

ΚΙΤ ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ GAMMACOAT® ΓΙΑ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΕΝΙΝΗΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO*.

Το κιτ ραδιοανοσοπροσδιορισμού GammaCoat [^{125}I] για τη δραστικότητα ρενίνης πλάσματος προορίζεται για χρήση στον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικότητας ρενίνης πλάσματος (PRA) με το ραδιοανοσοπροσδιορισμό της παραγόμενης αγγειοτενσίνης I.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η ρενίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο με μοριακό βάρος περίπου 40.000 που εκκρίνεται από τα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής του νεφρού. Το ένζυμο δρα στη γενική κυκλοφορία του αίματος για να προκαλεί τη διάσπαση του υποστρώματός του, μια α2-σφαιρίνη που σχηματίζεται στο ήπαρ, και να σχηματίσει το δεκαπεπτίδιο αγγειοτενσίνη I.

Η αγγειοτενσίνη I διασπάται ταχέως μέσω της δραστικότητας του μετατρεπτικού ενζύμου, που βρίσκεται κυρίως στον πνεύμονα, στο βιολογικώς δραστικό οκταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη II. Στη συνέχεια, η αγγειοτενσίνη II διασπάται ταχέως σε αδρανή τεμαχίδια πεπτιδίων μέσω ενζύμων που υπάρχουν στο πλάσμα και τους ιστούς, γνωστά ως αγγειοτενσινάσες. Η μεταβολική οδός του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης περιγράφεται παρακάτω:

υπόστρωμα ρενίνης
↓ ρενίνη
αγγειοτενσίνη I
↓ μετατρεπτικό ένζυμο
αγγειοτενσίνη II
↓ αγγειοτενσινάσες
αδρανή τεμαχίδια πεπτιδίου

Η αγγειοτενσίνη II έχει εξαιρετικά μικρή ημίσεια ζωή *in vivo*, αλλά είναι το πιο ισχυρό γνωστό αγγειοσυσπαστικό. Η αγγειοτενσίνη II παίζει βασικό ρόλο σε αρκετές μορφές υπέρτασης, καθώς και στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, έχει καθιερωθεί ότι η αγγειοτενσίνη II αποτελεί τον παράγοντα που επιδρά κυρίως στην έκκριση της αλδοστερόνης από το φλοιό των επινεφριδίων.

Οι τεχνικές δυσκολίες που σχετίζονται με τη μέτρηση των επιπέδων αγγειοτενσίνης II στο αίμα έχουν καθυστερήσει τη γενική αποδοχή του προσδιορισμού της στα κλινικά εργαστήρια. Εφόσον τα επίπεδα αγγειοτενσίνης I αποτελούν άμεση απεικόνιση της δραστικότητας ρενίνης πλάσματος, έχει υιοθετηθεί ευρέως ο προσδιορισμός της δραστικότητας ρενίνης πλάσματος για την αξιολόγηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης σε καταστάσεις ασθένειας. Η μέτρηση της δραστικότητας ρενίνης πλάσματος σε υπερτασικά άτομα αποτελεί σημαντικό βοήθημα στη διάκριση του πρωτοπαθούς από το δευτεροπαθή αλδεστερονισμό. Η εκτίμηση της δραστικότητας ρενίνης είναι επίσης πολύτιμη στον καθορισμό της πρόγνωσης και της καταλληλότερης θεραπείας για άτομα με ιδιοπαθή υπέρταση.

Έχει περιγραφεί ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την αγγειοτενσίνη I και την εφαρμογή της ως δείκτης της δραστικότητας ρενίνης πλάσματος.[1] Από τη μέθοδο αυτή έχει υιοθετηθεί η διαδικασία του κιτ GammaCoat για τον προσδιορισμό της δραστικότητας ρενίνης πλάσματος.

3. ΑΡΧΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η διαδικασία βασίζεται στις αρχές ανταγωνιστικής δέσμευσης του ραδιοανοσοπροσδιορισμού.[2] Στο κιτ RIA [^{125}I] GammaCoat για τη δραστικότητα ρενίνης πλάσματος, το αντίσωμα ακινητοποιείται στο κάτω εσωτερικό τοίχωμα του δοκιμαστικού σωλήνα GammaCoat. Ο προσδιορισμός της PRA περιλαμβάνει αρχική επώαση του πλάσματος για την παραγωγή αγγειοτενσίνης Ι, ακολουθούμενη από τον ποσοτικό προσδιορισμό της αγγειοτενσίνης Ι με ραδιοανοσοπροσδιορισμό. Η παραγωγή αγγειοτενσίνης Ι στο σύστημα υποστρώματος του ανθρώπου εξαρτάται από:

3.1 Το pH της επώασης.
3.2 Το βαθμό της αραίωσης του πλάσματος.
3.3 Την επιλογή των αναστολέων ενζύμου.
3.4 Άγνωστους παράγοντες σε κάθε ξεχωριστό δείγμα πλάσματος, όπως η συγκέντρωση του επιπέδου υποστρώματος ρενίνης.
3.5 Τη διάρκεια της επώασης.
3.6 Τη θερμοκρασία της επώασης.

pH παραγωγής
Ο ρυθμός παραγωγής της αγγειοτενσίνης Ι *in vitro* εξαρτάται από το pH. Η διαδικασία του κιτ αυτού χρησιμοποιεί pH παραγωγής ίσο με 6,0, το συνήθη pH των δειγμάτων μετά την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος pH 5,7. Το πλεονέκτημα της επώασης σε pH 6,0, σε αντίθεση με το φυσιολογικό pH 7, είναι ο διπλάσιος ρυθμός παραγωγής της αγγειοτενσίνης Ι με αντιστοίχως καλύτερη ευαισθησία για δείγματα με χαμηλή ρενίνη.[3-14] Ως αποτέλεσμα της βελτιστοποίησης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρότεροι χρόνοι παραγωγής.

Επιλογή αναστολέα ενζύμου
Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλειάδα μέσων για την αναστολή της ενζυμικής μετατροπής της αγγειοτενσίνης Ι σε αγγειοτενσίνη ΙΙ και την πρόληψη της πρωτεολυτικής διάσπασης κατά την παραγωγή αγγειοτενσίνης Ι.[15-17] Στη διαδικασία αυτή ως αναστολέας χρησιμοποιείται φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (PMSF).

Επιδράσεις της αραίωσης πλάσματος
Θα πρέπει να αποφευχθεί η αραίωση πλάσματος επειδή στη συγκέντρωση του υποστρώματος ρενίνης που συνήθως υπάρχει στο πλάσμα η αντίδραση της ρενίνης εξαρτάται από το υπόστρωμα. Οι επιδράσεις της αραίωσης υποστρώματος μπορούν να παρατηρηθούν καθ' όλη τη διάρκεια της παραγωγής και είναι εντονότερες σε μεγαλύτερη αραίωση.[4]

Διάρκεια της παραγωγής
Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο μικρότερος χρόνος που είναι πρακτικά δυνατός για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας προκειμένου να παραχθεί η βέλτιστη εκτίμηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης και να ελαχιστοποιηθεί η κατανάλωση υποστρώματος. Ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός της αγγειοτενσίνης Ι είναι αρκετά ευαίσθητος για να επιτραπεί ο προσδιορισμός της PRA με χρήση βελτιστοποιημένων συνθηκών για την παραγωγή αγγειοτενσίνης Ι σε pH 6,0.
Η μέθοδος του κιτ GammaCoat για τη δραστικότητα ρενίνης πλάσματος προσφέρει μειωμένο χρόνο παραγωγής επειδή το δείγμα πλάσματος αραιώνεται ελάχιστα, ρυθμίζεται σε βελτιστοποιημένο pH και αναλύεται με αναστολέα που είναι αποτελεσματικός στο επιλεγμένο pH. Υποδηλώνεται ότι δείγματα χαμηλών επιπέδων μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά με παραγωγή δειγμάτων για δεκαοκτώ ώρες και στη συνέχεια να εκτελεστεί ο προσδιορισμός τους.[4]

Διάρκεια ραδιοανοσοπροσδιορισμού
Η μέθοδος του κιτ GammaCoat για τη δραστικότητα ρενίνης πλάσματος χρησιμοποιεί επώαση ραδιοανοσοπροσδιορισμού τριών ωρών. Τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα εντός της ίδιας εργάσιμης ημέρας.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

Δοκιμαστικοί σωλήνες επικαλυμμένοι με αντιαγγειοτενσίνη Ι κονίκλου	1 σακούλα/100 δοκ. σωλ.	5 σακούλες/100 δοκ. σωλ.
Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού αγγειοτενσίνης (11x)	1 φιαλίδιο/10 mL	5 φιαλίδια/10 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα μηλεϊνικών παραγωγής αγγειοτενσίνης	1 φιαλίδιο/5 mL	3 φιαλίδια/5 mL
PMSF αγγειοτενσίνης	1 φιαλίδιο/1 mL	2 φιαλίδια/1 mL
Υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης	1 φιαλίδιο/3 mL	2 φιαλίδια/3 mL
Βαθμονομητές αγγειοτενσίνης (A έως F)	6 φιαλίδια/2 mL	12 φιαλίδια/2 mL
Ιχνηθέτης αγγειοτενσίνης	2 φιαλίδια/5 mL	10 φιαλίδια/5 mL
Αριθμός δοκιμών	100	500

ΦΥΛΑΞΗ: Μετά την παραλαβή του, το κιτ θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C. Μετά το άνοιγμα, φυλάξτε κάθε αντιδραστήριο όπως συνιστάται παρακάτω. Τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε περίπτωση που παρέλθει η ημερομηνία λήξης στην ετικέτα. Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί στην ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη.

Δεν ενδείκνυται η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

4.1 [^{125}I] Ιχνηθέτης αγγειοτενσίνης Ι: Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο.
Εκτελέστε ανασύσταση στο ιχνηθέτη αγγειοτενσίνη Ι [^{125}I] με προσθήκη 5 mL κεκαθαρμένου νερού. Αναμίξτε το φιαλίδιο καλά αναστρέφοντάς το ή στροβιλίζοντάς το απαλά σε όργανο περιδίνησης (vortex). Προσθέστε το περιεχόμενο των **δύο** φιαλιδίων ιχνηθέτη σε 100 mL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού. Το αντιδραστήριο ιχνηθέτης-ρυθμιστικό διάλυμα είναι σταθερό στους 2 έως 8°C έως την ημερομηνία λήξης του κιτ.
Μετά την ανασύσταση, κάθε φιαλίδιο περιέχει τουλάχιστον 1 μCi ιχνηθέτη (<1 μg/mL αγγειοτενσίνη Ι) σε 5 mL αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά με βόεια αλβουμίνη ορού και με θιμεροζάλη ως συντηρητικό.

4.2 Δοκιμαστικοί σωλήνες επικαλυμμένοι με αντιορό αγγειοτενσίνης Ι από κόνικλο: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Οι δοκιμαστικοί σωλήνες, 12 x 75 χλστ, είναι επικαλυμμένοι με αντιορό αγγειοτενσίνης Ι από κόνικλο (ισχύς<1 μg/δοκιμαστικό σωλήνα) και συσκευάζονται σε μια πλαστική σακούλα. Φυλάσσετε στους 2 έως 27°C.

4.3 Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού αγγειοτενσίνης (11X): Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο.
Προσθέστε όλο το περιεχόμενο του φιαλιδίου συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού σε 100 mL κεκαθαρμένο νερό και αναμίξτε καλά. Κάθε φιαλίδιο περιέχει 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με αζίδιο του νατρίου 0,1% ως συντηρητικό.

4.4 Ρυθμιστικό διάλυμα μηλεϊνικών παραγωγής αγγειοτενσίνης: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Κάθε φιαλίδιο περιέχει 5 mL ρυθμιστικό διάλυμα μηλεϊνικών, EDTA νατρίου, θειική νεομυκίνη και αδρανή κυανή βαφή με αζίδιο του νατρίου 0,1% ως συντηρητικό.

4.5 Φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο αγγειοτενσίνης: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.
Κάθε φιαλίδιο περιέχει 1 mL φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (PMSF) σε αιθανόλη.

4.6 Υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης: Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο.
Εκτελέστε ανασύσταση πριν από τη χρήση τοποθετώντας με πιπέτα 3,0 mL κεκαθαρμένο νερό στους 2 έως 8°C. Διατηρήστε το φιαλίδιο σε παγόλουτρο για 10 λεπτά, στροβιλίστε απαλά σε όργανο περιδίνησης ή στροβιλίστε ώστε να αναμιχθεί καλά. Διαιρέστε μέρη 1,0 mL σε προψυγμένους υάλινους ή πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Σφραγίστε ερμητικά και φυλάξτε στους -20°C. Αν θα εκτελέσετε προσδιορισμό άμεσα, μπορείτε να φυλάξετε ένα κλάσμα σε παγόλουτρο ή στο ψυγείο στους 2 έως 8°C.

Το ανασυσταθέν υλικό ελέγχου θα πρέπει να φυλάσσεται καταψυγμένο στους -20°C και είναι σταθερό για δύο τουλάχιστον μήνες. Η απόψυξη θα πρέπει να γίνει σε παγόλουτρο ή σε ψυγείο στους 2 έως 8°C και το ανασυσταθέν υλικό ελέγχου **δεν** θα πρέπει να καταψυχθεί μετά την απόψυξη.
Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στη PRA κατά τον επαναλαμβανόμενο προσδιορισμό του καταψυγμένου πλάσματος μετά από διάφορες περιόδους φύλαξης.[19,20] Επομένως, η χρήση καταψυγμένου πλάσματος ως υλικό ελέγχου σε προσδιορισμούς PRA ενδεχομένως να οδηγήσει σε αναξιόπιστα αποτελέσματα. Το υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης χρησιμοποιείται συνήθως κατά την παραγωγή αγγειοτενσίνης I, καθώς και σε ραδιοανοσοπροσδιορισμούς, παρέχοντας αξιόπιστο δείκτη ποιότητας ελέγχου για ολόκληρο τον προσδιορισμό. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα που αφορά τον ποιοτικό έλεγχο.
Μετά την ανασύσταση, κάθε φιαλίδιο περιέχει 3 mL επεξεργασμένο ανθρώπινο πλάσμα με αζίδιο του νατρίου 0,1%.

4.7 Βαθμονομητές αγγειοτενσίνης I (A έως F): Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το τυφλό και οι βαθμονομητές χρησιμοποιούνται **μόνο** στο βήμα του ραδιοανοσοπροσδιορισμού και **δεν** θα πρέπει να υποστούν παραγωγή αγγειοτενσίνης I.
Εκτελέστε ανασύσταση κάθε φιαλιδίου με 2,0 mL κεκαθαρμένο νερό και αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση. Στη συνέχεια, το τυφλό και οι βαθμονομητές θα πρέπει να καταψυχθούν σε παγόλουτρο πριν από τον προσδιορισμό. Μπορούν να φυλάσσονται στους 2 έως 8°C για δύο εβδομάδες και στους -20°C για μεγαλύτερους χρόνους φύλαξης.

Μετά την ανασύσταση, κάθε φιαλίδιο περιέχει 2 mL αγγειοτενσίνη I, BSA σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά. Οι βαθμονομητές έχουν βαθμονομηθεί στα 0, 0,2, 0,8, 3,0, 10,0 και 50,0 ng/mL, αντίστοιχα. Οι βαθμονομητές δραστικότητας ρενίνης πλάσματος της DiaSorin έχουν βαθμονομηθεί με χρήση της τρέχουσας κύριας παρτίδας παραγωγής. Ο χειρισμός των βαθμονομητών μπορεί να είναι ίδιος με αυτόν των δειγμάτων ασθενών όταν χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και η λειτουργική διαδικασία της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής *in vitro*, όπως συνιστάται.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO*.
Δεν προορίζεται για εσωτερική ή εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΛΙΚΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Χειριστείτε έως αν ήταν δυνητικώς μολυσματικά.
Κάθε μονάδα δότη ορού/πλάσματος που έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία του παρόντος προϊόντος έχει δοκιμαστεί με μέθοδο εγκεκριμένη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. και βρέθηκε μη αντιδραστική ως προς την παρουσία HBsAg, αντισώματος στον ιό HCV και αντισώματος στον ιό HIV 1/2. Αν και οι μέθοδοι αυτές είναι εξαιρετικά ακριβείς, δεν εγγυώνται την ανίχνευση όλων των μολυσματικών μονάδων. Το παρόν προϊόν ενδεχομένως να περιέχει και άλλο υλικό ανθρώπινης προέλευσης για το οποίο δεν υπάρχει εγκεκριμένη δοκιμή. Επειδή καμία γνωστή μέθοδος δοκιμασίας δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διαβεβαίωση ότι απουσιάζουν ο ιός της ηπατίτιδας B, ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, ο χειρισμός όλων των προϊόντων που περιέχουν υλικά ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με καλές εργαστηριακές πρακτικές χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις, όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 4η έκδοση, Μάιος 1999, ή την τρέχουσα έκδοση, των Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων/Εθνικά Ιδρύματα Υγείας).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μερικά αντιδραστήρια στο κιτ αυτό περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, εκπλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίων. Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts», στον οδηγό διαχείρισης ασφάλειας με κωδικό CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων στην Ατλάντα της Τζόρτζια, 1976.

Φράσεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)

R20/21/22 - Βλαβερό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

R32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΘΙΜΕΡΟΖΑΛΗ

Μερικά αντιδραστήρια του κιτ αυτού περιέχουν θιμεροζάλη η οποία περιέχει υδράργυρο. Η διάθεση του στοιχειακού υδραργύρου, του ανόργανου υδραργύρου, των οξειδίων του υδραργύρου και των ενώσεων υδραργύρου θα πρέπει να γίνεται με αυστηρή τήρηση όλων των τοπικών, πολιτειακών και ομοσπονδιακών κανονισμών.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί συγγενείς ανωμαλίες ή άλλες αναπαραγωγικές ανωμαλίες.

Φράσεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)

Αντιδραστήρια που περιέχουν αιθανόλη

R11 - Λίαν εύφλεκτο.

S16 - Μακριά από πηγές ανάφλεξης — Απαγορεύεται το κάπνισμα.

S43 - Σε περίπτωση πυρκαγιάς, χρησιμοποιήστε πυροσβεστήρες ξηρών χημικών ουσιών ή διοξείδιο του άνθρακα.

Αντιδραστήρια που περιέχουν PMSF

R23/24/25 - Τοξικό όταν εισπνέεται, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

S36 - Φορέστε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία.

S45 - Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθάνεστε αδιαθεσία, ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή.

Αντιδραστήρια που περιέχουν υδροξείδιο του καλίου

R35 – Προκαλεί εγκαύματα βαριάς μορφής.

S26 - Σε περίπτωση επαφής με τους οφθαλμούς, εκπλύντε αμέσως με άφθονο νερό και αναζητήστε ιατρική συμβουλή.

S37/39 - Φορέστε κατάλληλα γάντια και προστατευτικό οφθαλμών/προσώπου.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργά υλικά τα οποία δεν υπερβαίνουν τα 2 μCi (74 kBq – κιτ CA-1533) ή 10 μCi (370 kBq – κιτ CA-1553) ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρους που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές in vitro που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί καρκίνο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

6. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η δραστικότητα ρενίνης πλάσματος είναι υψηλότερη το πρωί λόγω της εναλλαγής της έκκρισης ρενίνης κατά τη διάρκεια της ημέρας και τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται πάντα το πρωί.[18,19] Συλλέγεται ασηπτικά δείγμα φλεβικού αίματος με χρήση κενού υάλινου δοκιμαστικού σωλήνα που περιέχει EDTA. Τα δείγματα μπορούν να συλλεχθούν, να μεταφερθούν και να φυγοκεντρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορείτε να αφήσετε το αίμα σε θερμοκρασία δωματίου για έξι ώρες, το μέγιστο, πριν τη φυγοκέντρηση χωρίς σημαντική συσσώρευση αγγειοτενσίνης I. Μετά τη φυγοκέντρηση του αίματος, το πλάσμα μπορεί να φυλάσσεται καταψυγμένο έως ότου γίνει ο προσδιορισμός του. Τα δείγματα μπορούν να φυλάσσονται καταψυγμένα στους -20°C για ένα μήνα. Θα πρέπει να αποφευχθούν κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης, οι οποίοι μπορούν να προκληθούν σε κατάψυξη με λειτουργία αυτόματης απόψυξης. Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στη PRA τόσο λόγω φύλαξης στους 2 έως 8°C, όσο και παρατεταμένης φύλαξης στους -20°C.[20, 21]

Πριν από τον προσδιορισμό, τα καταψυγμένα δείγματα θα πρέπει να αποψύχονται ταχέως σε θερμοκρασία δωματίου.

Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αιμολυόμενα, λιπαιμικά και ικτερικά δείγματα ή δείγματα στα οποία έχουν προστεθεί κιτρικά. Μη χρησιμοποιείτε ηπαρίνη ως αντιπηκτικό. Για πρόσθετες προφυλάξεις και πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα που αφορά τους διαδικαστικούς περιορισμούς.

7. ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ, ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- **7.1** Κεκαθαρμένο νερό.
- **7.2** Υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας, 37 ± 2°C.
- **7.3** Παγόλουτρο.
- **7.4** Ογκομετρικές πιπέτες (1, 2, 3 και 5 mL).
- **7.5** Βαθμονομημένος κύλινδρος (100 mL).
- **7.6** Πιπέτες ακρίβειας (10, 100, 500 και 1000 µL).
- **7.7** Μετρητής γάμα.
- **7.8** Πλαστικοί ή υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες, 12 x 75 χλστ (για παραγωγή αγγειοτενσίνης I).

7.9 Βάσεις δοκιμαστικών σωλήνων.

7.10 Όργανο περιδίνησης (vortex) (προαιρετικό).

7.11 Συσκευή αναρρόφησης νερού (προαιρετικό).

7.12 Απορροφητικό χαρτί με πλαστικό οπίσθιο τμήμα (προαιρετικό).

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ Ι

8.1 Μεταφέρετε 1,0 mL πλάσμα σε **μη επικαλυμμένο** υάλινο ή πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα σημειωμένο με τον αναγνωριστικό αριθμό και την κατάληξη 37.

8.2 Προσθέστε 10 μL διάλυμα PMSF και 100 μL ρυθμιστικό διάλυμα μηλεϊνικών παραγωγής (pH 6,0) σε κάθε κλάσμα 1,0 mL του βήματος 1. Αναμίξτε καλά και τοποθετήστε σε παγόλουτρο.

8.3 Μεταφέρετε 500 μL πλάσμα του δεύτερου βήματος στον αντίστοιχο καταψυγμένο δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος είναι σημειωμένος με την κατάληξη 4.

8.4 Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σειράς 37 σε υδατόλουτρο 37°C. Διατηρήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες της σειράς 4 σε παγόλουτρο. Εκτελέστε παραγωγή με ρυθμιστικό διάλυμα μηλεϊνικών για 90 λεπτά.

Έχει υποδειχθεί ότι δείγματα ασθενών με τιμές PRA μικρότερες από 1,0 ng/mL/hr μπορούν να παραχθούν με επώαση δεκαοκτώ ωρών και κατόπιν να γίνει ξανά ο προσδιορισμός τους.[4] Οι υπολογισμοί θα πρέπει να ρυθμιστούν ώστε να ανταποκρίνονται σε κάθε αλλαγή στο χρόνο παραγωγής.

8.5 Στο τέλος της περιόδου παραγωγής, αν ο προσδιορισμός πρόκειται να γίνει άμεσα, μεταφέρετε τα δείγματα της σειράς 37 σε παγόλουτρο ή, για μελλοντικό προσδιορισμό, σε κατάψυξη μαζί με τη σειρά 4.

9. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η διαδικασία του προσδιορισμού περιλαμβάνει την προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης από την οποία γίνεται η παρεμβολή της άγνωστης συγκέντρωσης αγγειοτενσίνης Ι στα δείγματα τόσο της σειράς 37 όσο και της σειράς 4. Το υπόβαθρο (σειρά 4) κατόπιν αφαιρείται από τα αντίστοιχα δείγματα παραγωγής της σειράς 37.

9.1 Αφήστε το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικό διάλυμα να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση. Διατηρήστε το τυφλό και τους βαθμονομητές, το παραγόμενο υλικό ελέγχου και τα παραγόμενα δείγματα ασθενών σε παγόλουτρο και αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση.

9.2 Επικολλήστε ετικέτα σε ένα σετ δοκιμαστικών σωλήνων GammaCoat εις διπλούν σύμφωνα με το ακόλουθο πλάνο. Για ορισμένα προγράμματα αναγωγής δεδομένων, ενδεχομένως να απαιτηθούν δοκιμαστικοί σωλήνες ολικών κρούσεων [T_1,T_2] και δοκιμαστικοί σωλήνες B_0 [1, 2], όμως μπορούν να παραληφθούν αν η καμπύλη βαθμονόμησης σχεδιάζεται σε χαρτί ημιλογαριθμικού γραφήματος.[23-25]

Αρ. δοκ. σωλ.	Περιεχόμενο δοκιμαστικών σωλήνων			Αριθμός κωδικού	Αγγειοτενσίνη Ι (ng/0,1 mL)
T_1,T_2	Συνολικές κρούσεις (ιχνηθέτης-ρυθμιστικό διάλυμα)				
1, 2	Τυφλό αγγειοτενσίνης Ι	0	ng/mL	A	0
3, 4	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,2	ng/mL	B	0,02
5, 6	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,8	ng/mL	C	0,08
7, 8	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	3,0	ng/mL	D	0,30
9,10	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	10,0	ng/mL	E	1,0
11,12	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	50,0	ng/mL	F	5,0
13,14	Υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης, 37°C παραγωγή				
15,16	Υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης, 4°C παραγωγή				
17,18	Ασθενής «Χ», 37°C παραγωγή				
19, 20	Ασθενής «Χ», 4°C παραγωγή				

9.3 Τοποθετήστε με πιπέτα στους κατάλληλους διπλούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

α. 100 μL από κάθε τυφλό αγγειοτενσίνης Ι ή βαθμονομητή.

β. 100 μL υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης των ομάδων παραγωγής «37» και «4» στην κατάλληλη ομάδα 4 δοκιμαστικών σωλήνων.

γ. 100 μL κάθε δείγματος ασθενή των ομάδων παραγωγής «37» και «4» στην κατάλληλη ομάδα 4 δοκιμαστικών σωλήνων.

9.4 Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, μαζί με αυτόν των ολικών κρούσεων, προσθέστε αμέσως 1,0 mL αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος. Αναμίξτε τα αντιδραστήρια στροβιλίζοντας κάθε δοκιμαστικό σωλήνα σε όργανο περιδίνησης.

9.5 Επωάστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 27°C) για τρεις ώρες.

9.6 Αναρροφήστε ή μεταγγίστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από αυτούς των συνολικών κρούσεων.

ΑΝ ΔΕΝ ΑΦΑΙΡΕΘΕΙ ΕΠΑΡΚΩΣ ΤΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΟ ΔΙΑΛΥΜΑ, ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΩΣ ΝΑ ΕΧΕΙ ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΝ ΠΤΩΧΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΚΑΙ ΨΕΥΔΕΙΣ ΤΙΜΕΣ.

Αν χρησιμοποιείτε τεχνική αναρρόφησης, βεβαιωθείτε ότι η πλαστική μύτη του δοκιμαστικού σωλήνα αναρρόφησης αγγίζει το κάτω μέρος του επικαλυμμένου δοκιμαστικού σωλήνα και ότι έχει αφαιρεθεί όλο το υγρό.

Αν χρησιμοποιείτε τεχνική μετάγγισης, αφήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες να αποστραγγίσουν ανάποδα για 3 έως 5 λεπτά. Χτυπήστε απαλά τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρύνετε τυχόν προσκολλημένο υγρό πριν τους τοποθετήσετε σε όρθια θέση.

9.7 Μετρήστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε μετρητή γάμα για ένα λεπτό με το άνοιγμα κατάλληλα ρυθμισμένο για ιώδιο 125.

9.8 Υπολογίστε τα αποτελέσματα. Ανατρέξτε στην παράγραφο που αφορά τα αποτελέσματα.

10. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Με το κιτ παρέχεται ένα υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης. Για ονομαστική τιμή, βλ. ετικέτα φιαλιδίου. Το υλικό ελέγχου πρέπει να υποστεί παραγωγή πριν από τον προσδιορισμό.

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να χρησιμοποιεί υλικά ελέγχου αρκετών επιπέδων για την παρακολούθηση της απόδοσης του προσδιορισμού. Ο χειρισμός των υλικών ελέγχου θα πρέπει να γίνεται όπως αυτός των άγνωστων δειγμάτων. Θα πρέπει να τηρούνται πίνακες ποιοτικού ελέγχου για να παρακολουθείται η απόδοση των υλικών ελέγχου. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την αξιολόγηση των τάσεων. Θα πρέπει να εξακριβωθούν τα αποδεκτά όρια απόδοσης για κάθε ξεχωριστό εργαστήριο.[22, 23]

11. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.1 Καταγράψτε τις κρούσεις ανά λεπτό (CPM) λόγω δέσμευσης για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.

11.2 Σε χαρτί ημιλογαριθμημένου γραφήματος, σχεδιάστε το CPM λόγω δέσμευσης για τους βαθμονομητές αγγειοτενσίνης I (κάθετος άξονας) συναρτήσει των δισεκατομμυριοστών γραμμαρίων (ng) αγγειοτενσίνης I που προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (οριζόντιος άξονας).

11.3 Σχεδιάστε την καμπύλη καλύτερης προσαρμογής. Για τυπικά δεδομένα, ανατρέξτε στον ΠΙΝΑΚΑ I. Το ΣΧΗΜΑ 1 απεικονίζει μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης.

11.4 Εντοπίστε το CPM λόγω δέσμευσης για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα στον κάθετο άξονα και σχεδιάστε μια οριζόντια γραμμή μέχρι αυτή να συναντήσει την καμπύλη βαθμονόμησης. Στο σημείο τομής, διαβάστε τα ng αγγειοτενσίνης I από τον οριζόντιο άξονα. Για κάθε δείγμα και υλικό ελέγχου, υπολογίστε τα μέσα ng «37» και τα μέσα ng «4».

12. ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΕΝΙΝΗΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (PRA)

Η δραστικότητα ρενίνης πλάσματος (PRA) εκφράζεται σε ng/mL/hr της παραγόμενης αγγειοτενσίνης I. Γίνονται οι ακόλουθες μαθηματικές διορθώσεις για να ληφθούν ng/mL/hr:

12.1 Αφαιρέστε τη μέση τιμή «4» (υπόβαθρο) από τη μέση τιμή «37» (παραγόμενο):

Καθαρά ng = ng «37» – ng «4»

12.2 Μέγεθος δείγματος που προσδιορίστηκε στον επικαλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα (C): 0,1 mL_C

12.3 Αραίωση δείγματος (S) με ρυθμιστικό διάλυμα παραγωγής (B) και αναστολέα (I):

$$\frac{(1{,}0\ mL_S + 0{,}1\ mL_B) + 0{,}01\ mL_I}{1{,}0\ mL_S} = \frac{1{,}11\ mL_{Αρχ.}}{1{,}00\ mL_{Τελ.}}$$

12.4 Χρόνος παραγωγής αγγειοτενσίνης I: 1,5 ώρες

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αν μεταβληθεί ο χρόνος παραγωγής, θα πρέπει να γίνει η αντίστοιχη αλλαγή στον αριθμό αυτό.

12.5 Υπολογισμός μηλεϊνικής παραγωγής:

$$PRA = \frac{\left(\frac{ng\ "37" - ng\ "4"}{0{,}1\ mL_C}\right) \times \left(\frac{1{,}11\ mL}{1{,}00\ mL}\right)}{1{,}5\ ώρα}$$

PRA = (7,40/mL/hr) x (καθαρά ng)

Παράδειγμα: Δείγμα πλάσματος ασθενή «X»:

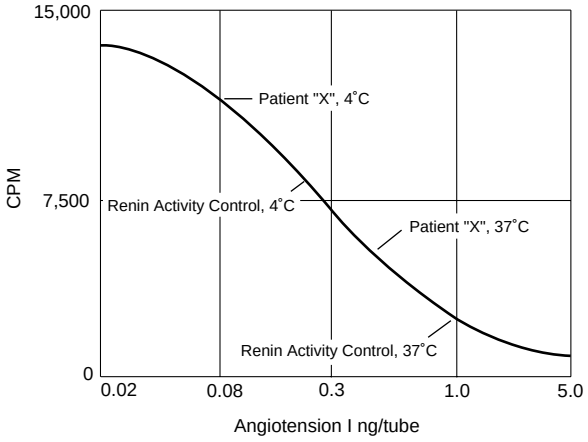
PRA = (0,41 - 0,08) ng x (7,40/mL/hr)

PRA = 2,44 ng/mL/hr

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι
Καταγραφή δεδομένων
Να μη χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό άγνωστων δειγμάτων

Αρ. δοκ. σωλ.	Περιεχόμενο δοκιμαστικών σωλήνων			CPM δεσμευμένου	Επίπεδο αγγειοτενσίνης Ι (ng/δοκ. σωλ.)	Τελική PRA (ng/mL/hr)
T_1	Συνολικές κρούσεις (ιχνηθέτης-ρυθμιστικό διάλυμα)			29242	–	–
T_2	Συνολικές κρούσεις (ιχνηθέτης-ρυθμιστικό διάλυμα)			28992	–	–
1	Τυφλό αγγειοτενσίνης Ι	0	ng/δοκ. σωλ.	13617	–	–
2	Τυφλό αγγειοτενσίνης Ι	0	ng/δοκ. σωλ.	13048	–	–
3	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,02	ng/δοκ. σωλ.	13163	–	–
4	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,02	ng/δοκ. σωλ.	12625	–	–
5	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,08	ng/δοκ. σωλ.	11305	–	–
6	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,08	ng/δοκ. σωλ.	11291	–	–
7	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,3	ng/δοκ. σωλ.	6991	–	–
8	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	0,3	ng/δοκ. σωλ.	7110	–	–
9	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	1,0	ng/δοκ. σωλ.	3053	–	–
10	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	1,0	ng/δοκ. σωλ.	3056	–	–
11	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	5,0	ng/δοκ. σωλ.	1307	–	–
12	Βαθμονομητής αγγειοτενσίνης Ι	5,0	ng/δοκ. σωλ.	1232	–	–
13	Υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης, 37°C			3149	0,97	
14	Υλικό ελέγχου δραστικότητας ρενίνης, 37°C			3053	1,01	
				Μέσος όρος:	0,99	
15	Υλικό έλεγχου δραστικότητα ρενίνης, 4°C			8674	0,20	
16	Υλικό έλεγχου δραστικότητα ρενίνης, 4°C			8607	0,20	
				Μέσος όρος:	0,20	5,85
17	Δείγμα πλάσματος ασθενή «Χ», 37°C			4362	0,41	
18	Δείγμα πλάσματος ασθενή «Χ», 37°C			4459	0,40	
				Μέσος όρος:	0,41	
19	Δείγμα πλάσματος ασθενή «Χ», 4°C			8546	0,08	
20	Δείγμα πλάσματος ασθενή «Χ», 4°C			8557	0,08	
				Μέσος όρος:	0,08	2,44

Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης
Να μη χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό άγνωστων δειγμάτων



ΣΧΗΜΑ 1

13. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Διαδικασία

13.1 Η πλαστική σακούλα με τους επικαλυμμένους δοκιμαστικούς σωλήνες θα πρέπει να κλειστεί με ασφάλεια κατά τη φύλαξη των δοκιμαστικών σωλήνων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί και η θερμοκρασία της θα πρέπει να διατηρείται στους 2 έως 27°C.

13.2 Η στάθμη νερού θα πρέπει να παραμένει υψηλότερα από αυτή του διαλύματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς όμως να επιπλέουν οι δοκιμαστικοί σωλήνες.

13.3 Ο χρήστης θα πρέπει να λάβει υπόψη ότι μπορούν να προκληθούν εσφαλμένα αποτελέσματα από το λανθασμένο χειρισμό των δειγμάτων ασθενών.

13.4 Πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή στη διατήρηση της θερμοκρασίας του παγόλουτρου κατά τη συλλογή και τον επακόλουθο χειρισμό των δειγμάτων.

13.5 Η απόψυξη των καταψυγμένων δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται ταχέως σε θερμοκρασία δωματίου και αυτά να αναμιγνύονται καλά πριν από την τοποθέτησή τους με πιπέτες.

13.6 Έχει σημειωθεί ότι η ηπαρίνη αναστέλλει την αντίδραση ρενίνης σε συγκεντρώσεις 5 IU/mL. Επομένως, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείτε ηπαρίνη ως αντιπηκτικό σε δείγματα αίματος στα οποία πρόκειται να γίνει προσδιορισμός για δραστικότητα ρενίνης πλάσματος.[5]

13.7 Τα αιμολυοποιημένα δείγμα περιέχουν αγγειοτενσινάσες και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν.

13.8 Δημοσιευμένα δεδομένα παρουσίασαν ενδείξεις ότι δεν μπορεί να θεωρηθεί γραμμικότητα της παραγωγής αγγειοτενσίνης I κατά τη διάρκεια προκαθορισμένης περιόδου παραγωγής, από τριάντα λεπτά έως δεκαοκτώ ώρες.[3] Η εκτροπή από τη γραμμικότητα ενδεχομένως να αποτελεί τον κανόνα και όχι την εξαίρεση ακόμη και κάτω από ελεγχόμενη ρύθμιση σε οποιοδήποτε pH. Ενδεχομένως παράγοντες διαφορετικοί από το pH μπορούν να επηρεάσουν τη γραμμικότητα της παραγωγής αγγειοτενσίνης I. Έως ότου τέτοιες μεταβλητές είναι πραγματικά ελεγχόμενες, θα πρέπει να αναμένονται χαρακτηριστικά μη γραμμικότητας.

13.9 Αν δεν λαμβάνετε σωστές τιμές για τα υλικά ελέγχου, ενδεχομένως οι χειρισμοί να είναι ανακριβείς, η διακίνηση λανθασμένη ή τα αντιδραστήρια να έχουν υποβαθμιστεί. Για κάθε εκτέλεση, θα πρέπει να καθιερωθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης βάσει των κατάλληλων τιμών για βαθμονομητές.

Ερμηνεία

Για την ακριβή ερμηνεία των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού, είναι κρίσιμο να ληφθούν υπόψη οι φυσιολογικές μεταβλητές, όπως η στάση του ασθενή και η πρόσληψη με την τροφή νατρίου ή η 24ωρη απέκκριση νατρίου από τα ούρα. Η ηλικία, το φύλο και η φυλή είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη.

Οι μεταβολές στην PRA μπορεί να επηρεαστούν από μια ποικιλία φαρμάκων, όπως διουρητικά, αδρενεργικοί παράγοντες αναστολής, αγγειοδιασταλτικά, ανθυπερτασικά, μεγάλες δόσεις προγεστερόνες, ανταγωνιστές αγγειοτενσίνης ΙΙ, από του στόματος χορηγούμενα αντισυλληπτικά ή θεραπεία με οιστρογόνα και αλατοκορτικοειδείς ανταγωνιστές. Η χρήση διατριζοϊκού, όπως στην νεφρογραφία, μπορεί επίσης να επηρεάσει τις τιμές της PRA. Αν δεν ληφθεί υπόψη η φαρμακολογική συνεισφορά της λήψης φαρμάκων του ασθενή, ενδεχομένως να προκληθεί λανθασμένη ερμηνεία των τιμών της PRA.

Διάφορες κλινικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της φυσιολογικής κύησης, επηρεάζουν την PRA. Οι παράγοντες αυτοί έχουν περιγραφεί περιληπτικά σε δημοσιευμένες ανασκοπήσεις από αρκετούς ερευνητές.[27-30]

14. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η κλινική αξιολόγηση του παρόντος κιτ PRA εκτελέστηκε από έναν ανεξάρτητο ερευνητή και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην παρούσα ενότητα. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται προορίζονται ως οδηγός για τη χρήση του παρόντος κιτ. Λόγω διαφορών στους πληθυσμούς ασθενών, συνιστάται στους χρήστες να καθιερώσουν τα δικά τους δεδομένα (για παράδειγμα, νομογράφημα PRA συναρτήσει της έκκρισης νατρίου).

14.1 Επίδραση της πρόσληψης με την τροφή άλατος

Λήφθηκαν δείγματα πλάσματος και συλλογές ούρων 24ώρου από φυσιολογικούς ενήλικες χωρίς καμία φαινομενική καρδιοαγγειακή ή νεφρική νόσο. Κάθε άτομο ακολούθησε δίαιτα με γνωστή ποσότητα νατρίου και καλίου. Μετά από περίοδο ισορρόπησης, συλλέχθηκαν τα δείγματα πλάσματος για τη PRA και τα δείγματα ούρων 24ώρου. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ ΙΙ. Τα δεδομένα διαιρέθηκαν σε τέσσερις υποομάδες βάσει του εύρους της έκκρισης νατρίου που παρατηρήθηκε: *ad libitum* πρόσληψη με την τροφή άλατος (75 έως 150 mEq/24ωρο.) Δίαιτα με συμπλήρωμα άλατος (150 mEq/24 ωρο); και δύο δίαιτες με περιορισμό άλατος. Είναι εφικτό σε συνήθεις κλινικές συνθήκες να λαμβάνονται μέτριες μειώσεις σε έκκριση νατρίου, μέχρι 30 έως 75 mEq/24ωρο Η χαμηλότερες τιμές στο εύρος έκκρισης νατρίου, 0 έως 30 mEq/24ωρο, είναι ασυνήθιστες και απαιτούν αυστηρό περιορισμό της πρόσληψης με την τροφή νατρίου. Παρατηρήθηκε η προβλεπόμενη αντίστροφη σχέση μεταξύ της PRA και της έκκρισης νατρίου στα ούρα. Εφόσον η περιεκτικότητα άλατος στη δίαιτα διαφέρει κατά τόπους, προτείνεται τα δεδομένα PRA συναρτήσει της έκκρισης νατρίου να αναπτύσσονται από κάθε ξεχωριστό εργαστήριο.

Κατά τη διάρκεια της κλινικής αξιολόγησης του παρόντος κιτ, λήφθηκαν δείγματα από περιπατητικούς ή νοσηλευόμενους ασθενείς χωρίς φαινομενική καρδιοαγγειακή ή νεφρική νόσο. Οι ασθενείς αυτοί λάμβαναν προσλήψεις με την τροφή άλατος *ad libitum* και δεν έγινε καμία προσπάθεια για τον έλεγχο των δραστηριοτήτων τους. Όλα τα δείγματα λήφθηκαν μεταξύ 8 και 10 το πρωί. Τα δεδομένα των παρατηρήσεων αυτών παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ ΙΙΙ. Εμπίπτουν εντός του εύρους PRA που παρατηρήθηκε για τους ασθενείς που λάμβαναν κανονική πρόσληψη με την τροφή άλατος για τον πληθυσμό αυτό. Οι υψηλότερες τιμές των νοσηλευόμενων ασθενών ενδεχομένως να οφείλονται σε αλλαγές του άλατος στη δίαιτα που επιβάλλονται από το νοσοκομειακό φαγητό, το στρες που προκαλείται από το νοσοκομειακό περιβάλλον ή άλλους ακαθόριστους παράγοντες.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ
PRA με περιορισμένη πρόσληψη με την τροφή άλατος

Έκκριση Na+ mEq/24ωρο	Μέσος όρος ± 1 Τ.Α. (ng/mL/hr)
0 έως 30	16,34 ± 7,52
30 έως 75	5,91 ± 1,82
75 έως 150	2,12 ± 0,68
>150	0,85 ± 0,46

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ
PRA με πρόσληψη με την τροφή άλατος ad libitum

	Μέσος όρος ± 1 Τ.Α. (ng/mL/hr)
Τυχαία περιπατικά φυσιολογικά άτομα	1,67 ± 0,83
Μη περιπατικά φυσιολογικά άτομα	3,30 ± 1,85

14.2 Επίδραση της θέσης
Η ακριβής εκτίμηση των τιμών PRA εξαρτάται από τη γνώση του κλινικού ιατρού για τη στάση του ασθενή, εφόσον οι τιμές PRA επηρεάζονται από αυτήν. Η επίδραση που έχει η υπόθεση όρθιας θέσης μετά από ολονύκτιο ύπνο σε ύπτια θέση υποδηλώνεται στον ΠΙΝΑΚΑ IV.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV
Επίδραση θέσης

	Μέσος όρος ± 1 Τ.Α. (ng/mL/hr)
Ύπτια	1,24 ± 1,09
Όρθια	2,63 ± 1,32

14.3 Διέγερση φουροσεμίδης
Η κλινική αξιολόγηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης ενδεχομένως να απαιτεί την αξιολόγηση της αλλαγής PRA μετά από διέγερση. Η επίδραση της φουροσεμίδης στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης, όπως ανιχνεύτηκε από την αλλαγή PRA, υπολογίστηκε από μια μελέτη που συνοψίζεται στον ΠΙΝΑΚΑ V. Υπήρχε σημαντική αύξηση σε τιμές PRA με τη διέγερση φουροσεμίδης.

ΠΙΝΑΚΑΣ V
Διέγερση φουροσεμίδης *

	Μέσος όρος ± 1 Τ.Α. (ng/mL/hr)
Πριν τη διέγερση	2,36 ± 1,23
Μετά τη διέγερση	6,92 ± 2,76

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Κατόπιν αίτησης στο τμήμα εξυπηρέτησης πελατών, διατίθεται μονογραφία που περιγράφει με λεπτομέρεια ολόκληρη την αξιολόγηση. Η μονογραφία περιέχει τα αποτελέσματα των ακόλουθων μελετών:

1. Αλδοστερόνη ούρων συναρτήσει PRA.
2. Μελέτες ρενίνης νεφρικής φλέβας σε ασθενείς με νεφροαγγειακή υπέρταση.
3. Προσδιορισμός PRA σε ασθενείς χωρίς νεφρό.
4. Προσδιορισμός PRA σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.
5. Προφίλ ρενίνης σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπέρταση.

* πέντε ώρες μετά την από του στόματος χορήγηση 40 mg φουροσεμιδη.

15. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

15.1 Αναλυτική ευαισθησία

Η ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης ορίζεται ως η μικρότερη μοναδική τιμή που μπορεί να διακριθεί από το μηδέν. Η στατιστική εκτίμηση της ελάχιστης ανιχνεύσιμης συγκέντρωσης (ευαισθησία) υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του D. Rodbard, (1978),[31] για τριάντα επαναλήψεις στο μηδενικό σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης. Η υπολογισμένη ευαισθησία είναι 0,018 ng/δοκιμαστικό σωλήνα.

15.2 Ακρίβεια

Η ακρίβεια για τον ίδιο προσδιορισμό υπολογίστηκε από το μέσο όρο είκοσι προσδιορισμών που εκτελέστηκαν ταυτόχρονα σε κάθε δείγμα. Η ακρίβεια μεταξύ σειράς προσδιορισμών υπολογίστηκε από το μέσο όρο επαναλήψεων για είκοσι διαφορετικές εκτελέσεις.

Δείγμα ακρίβειας για τον ίδιο προσδιορισμό	Αριθμός προσδιορισμών	Μέσος όρος (ng/mL/hr)	Τυπική απόκλιση (ng/mL/hr)	Συντελεστής διακύμανσης
Δεξαμενή πλάσματος Α	20	1,6	0,16	10,0
Δεξαμενή πλάσματος Β	20	6,2	0,28	4,6
Δεξαμενή πλάσματος Γ	20	17,9	1,68	9,4

Δείγμα ακρίβειας μεταξύ σειράς προσδιορισμών	Αριθμός προσδιορισμών	Μέσος όρος (ng/mL/hr)	Τυπική απόκλιση (ng/mL/hr)	Συντελεστής διακύμανσης
Δεξαμενή πλάσματος Α	20	1,6	0,09	5,6
Δεξαμενή πλάσματος Β	20	10,7	0,82	7,6
Δεξαμενή πλάσματος Γ	20	15,2	1,04	6,8

15.3 Ισχύς σύνδεσης αντιγόνου - αντισώματος

Η σταθερά συγγένειας, κατόπιν υπολογισμού, του αντιορού του κιτ αυτού είναι περίπου 3×10^{10} λίτρα/mole.

15.4 Αναλυτική ειδικότητα

Τα δεδομένα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας του αντιορού που χρησιμοποιείται στο παρόν κιτ εκφράζονται ως ο λόγος της συγκέντρωσης αγγειοτενσίνης Ι προς τη συγκέντρωση της ουσίας με διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε 50% αναστολή της μέγιστης δέσμευσης.

Ένωση	% διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
Αγγειοτενσίνη Ι	100
Τετραδεκαπεπτίδιο*	0,02
Αγγειοτενσίνη ΙΙ	<0,03
Αγγειοτενσίνη ΙΙΙ	<0,03

* Συνθετικό υπόστρωμα ρενίνης,

ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ, ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ

REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/ REFERÊNCIAS/REFERENSER/ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Haber, E., et. al., **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** 29, 1349, (1969).
2. Yalow, R.S. and S.A. Berson, in **Principles of Competitive Protein Binding Assays,** Odell & Daughaday (eds.), Lippincott, Philadelphia, Ch. 1, (1971).
3. Osmond, D.H., et. al., **Clin. Biochem.,** 7, 52, (1974).
4. Sealy, J.E. and J.H. Laragh, **Am. J. Med.,** 55, 303, (1973).
5. Catt, K. and J. Douglas, in **Nuclear Medicine In Vitro,** Rothfeld (ed.), Lippincott, Philadelphia, Ch. 21, (1974).
6. Abe, K., et. al., **Jap. Circ. J. (Eng. Summary),** 36, 697, (1972).
7. McDonald, J.M. and G.A. Fischer, **Am. J. Clin. Path.,** 59, 858, (1973).
8. Viol, G.W., et. al., **Clin. Biochem.,** 5, 251, (1972).
9. Katz, F.H. and J.A. Smith, **Clin. Chem.,** 18, 528, (1972).
10. Favre, L., et. al., **Biochem. Biophys. Acta,** 302, 102, (1973).
11. Laragh, J.H., et. al., **Am. J. Med.,** 52, 633, (1972).
12. Corvol, P., et. al., **Ann. Endocr. (Paris),** 34, 57, (1973).
13. Cohen, E.L., et. al., **J. Lab. Clin. Med.,** 77, 1025, (1971).
14. Heise, C.M., **Clin. Chem.,** 21, 447, (1975).
15. Fahrney, D.E. and A.M. Gold, **J. Am. Chem. Soc.,** 85, 997, (1963).
16. Kodish, M.E. and F.H. Katz, **J. Lab. Clin. Med.,** 83, 705, (1974).
17. Goodfriend, T.L., in **Methods in Investigative Diagnostic Endocrinology: Peptide Hormones,** Berson & Yalow (eds.), American Elsevier, N.Y., 1158-1168, (1973).
18. Gordon, R.D., et. al., **J. Clin. Invest.,** 45, 1587, (1966).
19. Katz, F.H., et. al., **J. Clin. Endocr. Metab.,** 40, 125, (1975).
20. Osmond, D.H., et. al., **Can. J. Physiol. Pharmacol.,** 51, 705, (1973).
21. Sealey, J.E., **Clin. Chem.,** 37, 1811-1819, (1991).
22. Tonks, D.B., **Clin. Chem.,** 9, 217, (1963).
23. Rodbard, D., et. al., **J. Clin. Endocr.,** 28, 1412, (1968).
24. Rodbard, D. and J.E. Lewald, **Acta Endocr. (Copenhagen),** 147, 79, (1970).
25. Rodbard, D., **Clin. Chem.,** 20, 1255, (1974).
26. Rodbard, D. and D.M. Hutt, in **Radioimmunoassay & Related Procedures in Medicine,** I, Int. Atomic Energy Agency, Vienna, 165-192, (1974).
27. Laragh, J.H., in **Methods in Investigative & Diagnostic Endocrinology: Peptide Hormones,** Berson & Yalow (eds.), Am. Elsevier, N.Y., 28, 1174-1184, (1973).
28. Vagnucci, A.H. and A.P. Shapiro, **Metabolism,** 23, 273, (1974).
29. Oparil, S. and E. Haber, **N. Eng. J. Med.,** 291, 446, (1974).
30. Brunner, H.R., et. al., in **Hypertension Manual,** Laragh (ed.), Yorke Med. Books, N.Y., 71-86, (1974).
31. Rodbard, D., **Analytical Biochemistry,** 90, 1, (1978).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitäts-kennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbar-keitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
PMSF	Enzymatic inhibitor (phenylmethylsulpho nyl fluoride solution).	Inhibiteur enzymatique (solution de phénylméthylsulphon yl fluorure).	Enzyminhibitor (Phenylmethylsulfony l-fluorid-Lösung).	Inhibidor enzimático (solución de fenilmetilsulfonil fluoruro)	Inibitore enzimatico (soluzione di fluoruro fenilmetilsulfonile).
SORB	Solid phase (Coated tubes.)	Phase solide (Tubes enduits).	Festphase (Beschichtete Teströhrchen).	Fase sólida (Tubos recubiertos).	Fase solida (Cannule con rivestimento).
Ag ^{125}I	Tracer: antigen labelled with ^{125}I	Traceur : antigène marqué à l'iode ^{125}	Tracer: ^{125}I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ^{125}I	Tracciatore: antigene etichettato con ^{125}I
BUF	Buffer	Tampon	Puffer	Tampón	Tampone
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
	Highly flammable	Facilement inflammable	Leichtentzündlich	Fácilment inflamable	Facilment infiammabile
	Harmful	Nocif	Gesundheits-schädlich	Nocivo	Nocivo
	Toxic	Toxique	Giftig	Tóxico	Tossico
	Corrosive	Corrosif	Ätzend	Corrosivo	Corrosivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europeisk överensstämmeise	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Prazo de validade	Utgångsdatum	Ημερομηνία Λήξης
	Fabricante	Tilverkare	Κατασκευαστής
	Consulte as instruções de utilização	Se bruksanvisningen	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
IVD	Diagnóstico in vitro.	Diagnostik in vitro.	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
LOT	N.º do lote	Batch-nummer	Αρ. παρτίδας
	Limite de temperatura.	Temperatur-begränsning.	Περιορισμοί θερμοκρασίας
	Inibidor enzimático (solução de fluoreto de fenilmetilsulfonil).	Enzymatisk inhibitor (fenylmetylsulfonyl-fluoridlösning).	Ενζυμικός αναστολέας (φαινυλομεθυλοσουλφονυλο φθοριούχο διάλυμα).
SORB	Fase sólida (Tubos revestidos).	Solid fas (Belagda rör).	**Στερεή φάση (Επικαλυμμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες).**
Ag	Traçador: antígeno marcado com ^{125}I	Spårelement: antigen betecknad med ^{125}I	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σημασμένο με ^{125}I
BUF	Tampão	Buffert	Ρυθμιστικό διάλυμα
CAL	Calibrador	Kalibrator	Βαθμονομητής
	Radioactivo	Radioaktiv	Ραδιενεργό
	Facilmente inflamavel	Mycket brandfarligt	Πολύ εύφλεκτο
	Nocivo	Skadligt	Επιβλαβής
	Tóxico	Giftigt	Τοξικό
	Corrosivo	Frätande	Διαβρωτικό

DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-779-7847

For Customer Service in the
U.S. and Canada Call Toll Free:
800-328-1482

In the United Kingdom Call:
44 118 9364200
FAX: 44 118 9792061

27299
CA60410 9/03

PRINTED IN U.S.A.